

**MICROFABRICATED DETECTION STRUCTURES****Patent number:** JP7506430T**Publication date:** 1995-07-13**Inventor:****Applicant:** UNIV PENNSYLVANIA (US)**Classification:****- international:** G01N33/483; B01L3/00; C12M1/34; C12M3/08; C12Q1/68; G01N33/543**- european:** B01D61/18; B01D67/00H10D; B01D71/02; B01J19/00C; B01J19/00R; B01L3/00C6M; B01L7/00D; B01L7/00D2; C12M1/26; C12M1/34; C12M3/00; C12M3/08; C12Q1/68D4**Application number:** JP19930519499T 19930429**Priority number(s):** WO1993US04013 19930429; US19920877536 19920501; US19920877661 19920501; US19920877662 19920501; US19920877701 19920501; US19920877702 19920501**Also published as:**

WO9322421 (A1)

WO9322058 (A1)

WO9322058 (A1)

WO9322058 (A1)

WO9322055 (A3)

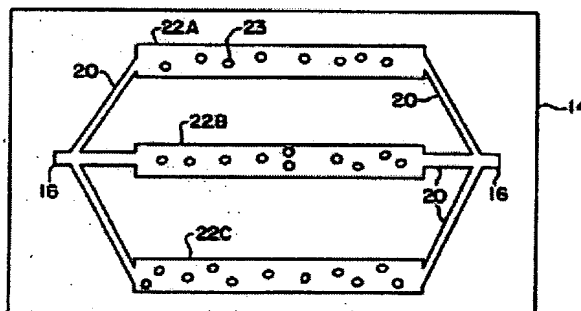
more &gt;&gt;

Report a data error here

Abstract not available for JP7506430T

Abstract of corresponding document: **WO9322053**

Disclosed are devices for detecting the presence of a preselected analyte in a fluid sample. The devices comprise a substrate microfabricated to define a sample inlet port (16), and a mesoscale flow system that includes a sample flow channel (20) extending from the inlet port. The mesoscale flow system further includes an analyte detection region (22) in fluid communication with the flow channel (20) comprised of a binding moiety for specifically binding the analyte. The detection region is constructed with a mesoscale dimension sufficiently small to enhance binding of the binding moiety and the analyte. The binding moiety may be immobilized in the detection region. The mesoscale detection systems of the invention may be used in a wide range of applications, including the detection of cells or macromolecules, or for monitoring reactions or cell culture growth.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-506430

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)7月13日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 33/483

C 7055-2 J

B 0 1 L 3/00

7351-4 G

C 1 2 M 1/34

A 7229-4 B

3/08

9050-4 B

C 1 2 Q 1/68

A 9453-4 B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-519499  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)4月29日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)10月28日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 4 0 1 3  
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 2 2 0 5 3  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)11月11日  
 (31) 優先権主張番号 8 7 7 , 5 3 6  
 (32) 優先日 1992年5月1日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 8 7 7 , 6 6 1  
 (32) 優先日 1992年5月1日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

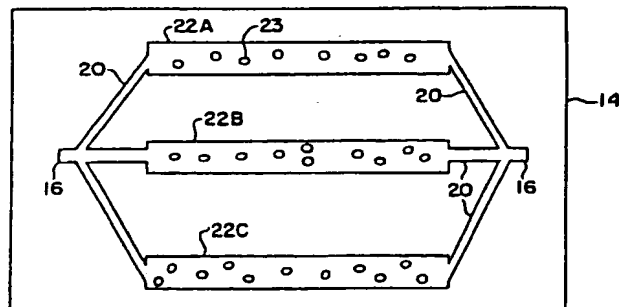
(71) 出願人 トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシテ  
 イ・オブ・ペンシルベニア  
 アメリカ合衆国19104ペンシルベニア州、  
 フィラデルフィア、スイート300、マーケ  
 ット・ストリート3700番  
 (72) 発明者 ワイルディング, ピーター  
 アメリカ合衆国19301ペンシルベニア州、  
 パオリ、ダービー・ロード208番  
 (72) 発明者 クリッカ, ラリー・ジェイ  
 アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州、  
 パーウィン、ネイサン・ヘイル・ロード  
 886番  
 (74) 代理人 弁理士 青山 篠 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微細加工した検出構造体

## (57) 【要約】

本発明は流体試料中の予め選択された分析物の存在を検出する装置を開示する。該装置は、試料流入ポート(16)、および該流入ポートから伸びる試料流動チャネル(20)を含むメソスケール流動システムを形成するように微細加工された基材からなる。該メソスケール流動システムは、さらに、分析物と特異的に結合する結合部からなる流動チャネル(20)と流体連絡している分析物検出領域(22)を含む。該検出領域を、結合部と分析物の結合を強化するために十分に小さなメソスケール寸法で構築する。該結合部は検出領域に固定化されている。本発明のメソスケール検出システムは、細胞または高分子の検出、または反応もしくは細胞培養増殖のモニター観察を包含する、広範な用途に用いることができる。



## 請求の範囲

1. 流体試料中の分析物の存在を検討するための装置であって、  
試料流入ポート；および  
該流入ポートから伸びる試料流動チャネルと；  
該分析物と特異的に結合する結合部からなる流動チャネルと流体連絡している分析物検出領域とからなり、該検出領域がメソスケールの寸法を有するメソスケール流動システムを形成するように微細加工された固体基材からなる該装置。
2. 該結合部が該検出領域に固定化されている請求項1記載の装置。
3. 装置が、さらに、該基材の該領域上に配置された該検出領域を光学的に観察するためのウィンドーを包含する請求項1記載の装置。
4. 該基材が、さらに、該分析物と結合して、該分析物の存在を示す検出可能なシグナルを発する標識物質を該検出領域にデリバリーするための手段を形成する請求項1記載の装置。
5. さらに、  
該基材の該領域上に配置された該検出領域を光学的に観察するためのウィンドーと、  
該ウィンドーを介して該検出可能なシグナルの存在を検出するための光学手段とからなる請求項4記載の装置。
6. 該分析物が抗原であって、該結合部が抗原結合蛋白質である請求項1記載の装置。
7. 該分析物がポリヌクレオチドであって、該結合部が該ポリヌクレオチドと塩基形成する相補的ポリヌクレオチドである請求項1記載の装置。
8. 該分析物と該固定化結合部がリガンド／レセプター対よりなる請求項1記載の装置。
9. 該光学的に検出可能なシグナルが発光シグナルである請求項4記載の装置。
10. 該光学的に検出可能なシグナルが蛍光シグナルである請求項9記載の装置。

らなる細胞分離領域と；

該微小試料の該分離領域への流れを、該結合部位により試料中の該細胞集団を捕獲して、該微小試料から該細胞集団を分離することを可能とするに十分に速い第1の流速；次いで該分離された細胞面分を該領域から放出させるのに十分に速い第2の流速にて誘導する手段と；

からなる請求項1記載の装置。

20. 該流動システムが、さらに；

複数の第2の流動チャネルに至る分岐部からなる該流動チャネルと流体連絡しているフラクタル領域と；

生物学的試料の、該流動チャネルと該フラクタル領域を通過する流れを誘導するための手段と

からなる請求項3記載の装置。

21. 該固体基材が微細加工されたシリコンからなる請求項1記載の装置。

22. 該試料流動チャネルおよび該検出領域が固体基材の表面に微細加工されており、かつ該表面に付着されたカバーによって囲まれている請求項1記載の装置。

23. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具からなる装置であって、該器具が；

該基材を保持するための手段と、

該基材上の流入ポートと相互適合する流体投入手段と、

該保持手段に保持されている場合、流体を該基材の流動システムを通過させるためのポンプ手段と

からなる請求項1記載の装置。

24. 該器具が、さらに、試薬溜めと、試薬を流動システムにデリバリーするための手段とからなる請求項23記載の装置。

25. さらに、該基材と組み合わせて用いるための器具からなり、

該器具が；

該基材を保持するための手段と、

該基材中の該メソスケール流動システムの内容物を観察するための光学手段と

11. 該分析物検出領域がその表面に分析物結合部位を有する粒子からなり、その粒子が分析物の存在にて、該ウィンドーを介して光学的に検出可能な粒子凝塊形成を誘発する請求項3記載の装置。

12. 該基材が、さらに、対照領域を光学的にプローブし、それにより該対照領域および検出領域において光学的に検出されたデータを比較することができる、該基材上の該対照領域上方に設けられた、試料流入ポートおよび対照領域ウィンドーと流体連絡した当該対照領域を形成する請求項3記載の装置。

13. 該分析物が該試料中の細胞集団であって、ここに、

該結合部が該細胞集団のメンバー上の表面蛋白質に結合して、該細胞集団の凝集を誘発し；および

該凝集が該ウィンドーを介して光学的に検出できる請求項3記載の装置。

14. 該基材が少なくとも第2のメソスケール流動システムを形成する請求項1記載の装置。

15. 該流動システムの分析物検出領域が種々の固定化結合部からなる請求項14記載の装置。

16. 該分析物が含細胞液体生物学的試料中の細胞内分子成分であって、装置が、さらに、

該流動チャネルと流体連絡している該メソスケール流動システム中の細胞溶解手段と、

該基材中の含細胞微小試料中の細胞を該細胞溶解手段に押し込み、それにより該細胞内分子成分を放出させるための手段と

からなる請求項1記載の装置。

17. 該細胞溶解手段が流動チャネルの壁から伸びている細胞膜貫通突起部を有する該流動チャネルの一部からなる請求項16記載の装置。

18. 該細胞溶解手段が、細胞の通過を阻止しつつ、細胞内分子を通過させるのに十分な制限された断面寸法の領域からなる請求項16記載の装置。

19. 該分析物が該試料中の細胞集団であって、装置が、さらに、

該分離領域の壁上に固定化された細胞表面蛋白質を結合させるための部位が

からなる請求項1記載の装置。

26. 該光学手段が拡大オブティックスと、ビデオカメラとからなる装置であって、ここに該器具が、さらに、

該装置の角度および位置を手動調整するための傾斜機構と、

該流動システムの内容物を観察するためのビデオスクリーンと

からなる請求項25記載の装置。

27. 流体試料中の分析物の存在を検討するための方法であって、

(i) 試料流入ポート；および

該流入ポートから伸びる試料流動チャネルと；

該分析物と特異的に結合する結合部からなる流動チャネルと流体連絡している分析物検出領域とからなり、該検出領域がメソスケールの寸法を有する

メソスケール流動システム

を形成するように微細加工された固体基材からなる装置を供し；

(ii) 該試料を該流入ポートへと、次いで、該流動システムを介して該検出領域へとデリバリーし；次いで、

(iii) 該検出領域における該結合部への該分析物の結合を検出する

工程からなることを特徴とする該検出方法。

28. 工程(i)にて供される装置中の該結合部が該検出領域に固定化されており、

工程(ii)が該分析物と該固定化結合部との結合を検出する工程を包含する請求項27記載の方法。

29. 工程(i)にて供される装置が、さらに、該基材の該検出領域上方に設けられたウィンドーからなり、

工程(ii)が該ウィンドーを介して該検出領域を光学的に観察する工程を包含する請求項27記載の方法。

30. 工程(i)にて供される装置が、さらに、該分析物に結合して、該分析物の存在を示す検出可能なシグナルを発する標識物質を該検出領域にデリバリー

するための手段からなる方法であって、さらに：

(iv) 標識化合物を該検出領域にデリバリーし；次いで、

(v) 該検出領域における該検出可能なシグナルを光学的に観察することからなる請求項27記載の方法。

31. 該光学的観察工程が発光シグナルを検出する工程を包含する請求項30記載の方法。

32. 工程(i)にて供される装置において、該分析物検出領域が、その表面に分析物結合部位を有する粒子からなり、それが、分析物の存在にて、粒子凝塊を誘発する方法であって；ここに、

工程(ii)にて、該分析物が該粒子に結合して、凝塊形成を誘発し；かつ

工程(iii)にて、凝塊形成を検出する請求項27記載の方法。

33. 工程(i)にて供される該基材が、さらに、該対照領域を光学的にプローブし、それにより、該対照領域および検出領域において光学的に測定されるデータを比較できるための、該基材上の該対照領域上に設けられた、試料流入ポートおよび対照領域ウィンドーと流体連絡した当該対照領域を形成する方法であって、

工程(iii)が該対照領域と該検出領域を光学的に観察し、比較する工程を包含する請求項29記載の方法。

34. 該分析物が該試料中の細胞集団である方法であって、

工程(ii)にて、該結合部が該細胞集団のメンバー上の表面蛋白質に結合して該細胞集団の凝集を誘発し；

工程(iii)にて、該凝集を該ウィンドーを介して光学的に検出する請求項29記載の方法。

35. 工程(i)にて供される該基材が少なくとも第2の該メソスケール流動システムを形成する方法であって、

工程(iii)にて、第1の、および少なくとも第2のシステム中の検出領域における結合を検出する請求項27記載の方法。

## 明 細 書

### 微細加工した検出構造体

#### 関連出願の引用

本願は以下の同時係属出願：米国特許出願第07/877,701号(1992年5月1日出願)；米国特許出願第07/877,536号(1992年5月1日出願)；米国特許出願第07/877,662号(1992年5月1日出願)；および米国特許出願第07/877,661号(1992年5月1日出願)と同時に提出されており、これらの開示を本明細書により本明細書の一部とみなす。

#### 発明の背景

本発明は、一般に、分析方法および分析用装置に関する。さらに詳しくは、本発明は流体試料についての所定の検定プロトコルを受け、かつ迅速に処理する能力を有する小型の、典型的には、一回使用のモジュールの設計および構築に関する。

近年の数10年間、技術は、種々の診断およびモニター観察を目的とするために、生物学的試料を分析するための非常に多くのプロトコル、試験キット、およびカートリッジを開発してきた。免疫検定、凝集検定、ポリマーゼ連鎖反応に基づく分析、多種のリガンド-レセプター相互作用、および複合試料中の種の分別移動は、すべて、種々の生物学的化合物または夾雑物の存在または濃度、あるいは特定の型の細胞の存在を測定するのに用いられてきた。

最近、生物学的試料を処理するための、およびある種の臨床的試験を行うための小型の使い捨て装置が開発された。ジョージ(Shoji)らは、シリコンウェーハ上に加工された小型の血液ガス分析器の使用を報告した[ジョージら、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators), 15:101-107(1988)]。サト(Sato)らは、微細機械加工シリコン装置を用いる細胞融合法を報告した[サト(Sato)ら、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators), A21-A23:948-953(1990)]。

36. 分析物が含細胞液体生物学的試料中の細胞内分子成分である方法であって、該基材内で細胞を溶解する付加工程からなり、工程(iii)の前に該細胞内分析物を放出させる請求項27記載の方法。

37. 該分析物が該試料中の細胞集団である方法であって、工程(iii)の前に該基材内で他の細胞から該細胞集団を分離する付加工程からなる請求項27記載の方法。

38. 少なくとも1つの流入ポートおよび該基材上の流入ポートから伸びるメソスケール流動システムを形成するように微細加工された固体基材を包含する分析装置と一緒に用いるための器具であって、該器具が；

該基材を保持するための手段；

該基材上の流入ポートと相互適合する流体投入手段；および

該保持手段に保持されている場合、流体を該基材の流動システムを通過させるためのポンプ手段

からなることを特徴とする器具。

39. さらに、試薬溜めと、試薬を該流動システムにデリバリーするための手段とからなる請求項38記載の器具。

40. さらに、該流動システム中の流体試料のパラメーターを検出するための検出手段からなる請求項39記載の器具。

41. 該分析物検出領域が曲がりくねったメソスケール流動チャネルからなり、該曲がりくねったチャネルが、該チャネルを流れる流体の混合および反応の時間を設定するような長さに微細加工されている請求項1記載の装置。

42. 該分析物検出領域が、さらに、該検出領域より上流の、曲がりくねったメソスケール流動チャネルからなる方法であって、

該曲がりくねったチャネルが、該検出領域にデリバリーされる前に該チャネルを介して流れる流体の混合および反応時間を設定するような長さに微細加工されており、かつ

工程(ii)が該試料を該曲がりくねったチャネルに、ついで該検出領域へとデリバリーする工程を包含する請求項27記載の方法。

チバ・コーニング・ダイアグノスティックス・コーポレーション(Ciba Corning Diagnostics Corp.) (USA) は血餅検出用のマイクロプロセス調整レーザー測光器を製造した。

微細機械加工技術はマイクロエレクトロニクスの産業分野に端を発する[アンゲル(Angell)ら、サイエンティフィック・アメリカン(Scientific American), 248:44-55(1983)]。微細機械加工技術は数十ミクロン(生物学的小細胞の大きさ)からナノメートル(ある生物学上の高分子の大きさ)までの範囲の最小の構造エレメントを有するマイクロエンジニア装置の製造を可能とした。このスケールを、本明細書にて「メソスケール」という。メソスケールの構造に関連する大部分の実験は微細機械加工、すなわち、機械的運動および流動特性の研究を包含する。メソスケール構造の能力はライフサイエンスの分野にて十分に活用されていない。

ブルネット(エクスペリメンタル・セル・リサーチ(Exper. Cell Res.), 167:203-217(1986)および164:11-26(1986))は、シリコン、チタン被覆ポリマーなどの溝中に繊維芽細胞および上皮細胞の行動を研究した。マッカートニー(McCartney)ら(カンサー・リサーチ(Cancer Res.), 41:3046-3051(1981))は溝を付したプラスチック基材中に腫瘍細胞の行動を試験した。ラセル(LaCelle)(ブラッド・セルズ(Blood Cells), 12:179-189(1986))はマイクロキャピラリー中の白血球および赤血球の流動性を研究し、微小循環に対する阻害を得た。ハングおよびワイスマン(HungおよびWeissman)は微細機械加工されたチャネル中の流体力学についての研究を報告したが、分析装置に関連するデータを作成しなかった[ハング(Hung)ら、メディカル・アンド・バイオロジカル・エンジニアリング(Med. and Biol. Engineering), 9:237-245(1971)；およびワイスマン(Weissman)ら、アム・インスト・ケム・エング・ジェイ(Am. Inst. Chem. Eng. J.), 17:25-30(1971)]。コロンブス(Columbus)らは、生物学的流体の毛管流動性の調整において2つの直交して配向したV字溝を付したシートからなるサンドウィッチ部を、実験的複数チャネル

試験装置中の鋼々のイオン選択性電極に用いた【コロンブス (Columbus) ら、クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.), 33: 1531-1537 (1987)】。マズダ (Masuda) らおよびワシズ (Washizu) らは、細胞を操作 (例えば、細胞融合) するための流体流動チャンバーの使用を報告している【マズダ (Masuda) ら、プロシーディングス・IEEE/IAS・ミーティング (Proceedings IEEE/IAS Meeting), 1549-1553頁 (1987) ; およびワシズ (Washizu) ら、プロシーディングス・IEEE/IAS・ミーティング, 1735-1740頁 (1988)】。該文献は生物学的流体を分析するためのおよび微生物を検出するためのメソスケール装置の使用の可能性をそれほど探求していない。

微生物の検出用に用いる近年の分析法は、自動化されているのが稀であり、通常、適当な培地中にインキュベートして微生物を増殖させ、必ず視覚的および/または化学的方法を用いてその菌株または亜種を同定する必要がある。そのような方法における固有の遅れは、感染症の性質を決定する前に、頻りに医療介入を必要とする。産業、一般の健康または臨床的環境下、そのような遅れは重大な結果をもたらすかもしれない。微生物を速やかに検出するための都合のよいシステムについての要求がある。

本発明の目的は、試料の微量を分析し、極く低濃度にて存在する物質を検出し、速やかに分析結果を呈示できる最適反応環境を有する分析システムを提供することである。もう一つ別の目的は、生物学的および他の適用範囲にて、予め選択された分子または細胞分析物を迅速にて自動的に分析可能なメソスケール機能性エレメントを有する、量産が容易で、使い捨ての小型 (例えば、容積が1cc未満) の装置を提供することである。本発明のさらに別の目的は、個人で、一連の迅速な臨床試験、例えば細菌侵入、ウイルス感染、精子運動性、血液パラメーター、食品、水または体液中夾雑物などについての試験を行うのに用いることができるそのような一群の装置を提供することである。

#### 発明の要約

本発明は流体試料中の予め選択された分析物を検出するための方法および装置を提供する。該装置は、典型的には、2ないし3mm厚のオーダーで、適当には

よい。該装置は、典型的には、微量 (<5 $\mu$ L) の試料を分析するのに適する大きさに設計されており、例えば、基材を介するかまたは透明なカバースリップを介する流動システムとの孔連絡によって、形成された流入ポートを通して流動システム中に導入される。微量の試料流体中に極低濃度 (例、ナノグラム量) にて存在する細胞または他の分析物を速やかに (例えば、<10分) 分析できる。

チップは、典型的には、器具と一緒に用いられ、該器具は該チップを保持するための嵌め合わせ部位を有し、該チップ上の投入ポートを器具の流動ラインと接合させる。特定の分析物、細胞性夾雑物、またはトキシンを含有すると考えられる生物学的流体、例えば血液、血漿、血清、尿、痰、唾液または他の流体を基材の流入ポートに加え、チップを器具に設置し、ポンプを動作させて試料を流動システムを介して押しやる。また、試料を器具によりチップ中に注入してもよく、または試料を毛管作用により流入ポートを介してチップのメソスケールの流動システムに入れてもよい。

装置中、分析物の結合部への結合は、試料中の分析物の存在について陽性表示として供する。メソスケールの検出領域は、予め選択された分析物に特異的に結合する能力を有する結合部を備えている。結合部は、例えば、溶液にて検出領域にデリバリーすることができる。また、結合部は検出領域に固定化されていてもよい。特異的流体試料構成物を検出または分離するために、装置のメソスケールの検出領域の内面を固定結合部で被覆し、その表面を流体試料と相互作用させることができる。抗体またはポリヌクレオチドプローブを流動チャネルの表面に固定し、メソスケールの流動システムを免疫検定またはポリヌクレオチド鎖形成検定について使用することができる。結合部はまた、リガンドまたはレセプターからなっているともよい。細胞表面分子を介して細胞との結合能を有する結合部を用いて、生物学的微小試料中の細胞集団を単離または検出することができる。メソスケールの流動システムはまた、突出部または断面積が減少しているセクションからなっているともよく、流動システムを流れる微小試料中の細胞の分別または溶解を可能とする。

検出領域中の結合部に結合する分析物は、例えば、検出領域の上方にある透明

0.2~2.0平方cmの、試料流入ポートおよびメソスケールの流動システムを形成するように微細加工された (microfabricated) 固体基材からなる。「メソスケール」なる語は、本明細書中、0.1 $\mu$ m~500 $\mu$ mのオーダーの断面を有するチャンパーおよび流路を定義するのに用いる。メソスケールの流動チャネルおよび流体処理領域は、好ましい深さが0.1 $\mu$ m~100 $\mu$ m、典型的には2~50 $\mu$ mのオーダーである。該チャネルは、2.0 $\mu$ m~500 $\mu$ m、さらに好ましくは3~100 $\mu$ mのオーダーの好ましい幅を有する。多くの適用には、5~50 $\mu$ m幅のチャネルが有用である。基材中のチャンパーは、しばしば、より大きな寸法、例えば2ないし3mmの寸法を有する。

該装置のメソスケールの流動システムは、流入ポートから伸びる試料流動チャネルと、流動チャネルと流体連絡している分析物検出領域とからなる。その分析物検出領域は、分析物と特異的に結合するように、所望によりその間に固定されていてもよい、結合部を備えている。その検出領域のメソスケールの寸法は、動力学的に結合部と分析物の結合を容易にする。すなわち、検出領域中、複数回の分子衝突が起こるように、反応体は限定された空間にて互いに密集した状態にある。該装置は、細胞または高分子の分析を包含する、または反応もしくは細胞増殖をモニター観察するための、種々の自動化された、感度良好かつ迅速な臨床試験を行うのに用いてもよい。

一般に、本明細書にて開示されているように、固体基材は、メソスケールの流動システムを有するチップからなる。該チップは機能的な幾何学的特徴と微量の分析物の検出を行うのに臨床化学において周知の型を組み合わせて活用するように設計されている。メソスケールの流動システムは、確立された微細機械加工法を用いてシリコンおよび他の固体基材から、またはポリマー材料を成型することにより設計加工されていてもよい。装置中のメソスケールの流動システムは、流動チャネル (複数) および検出領域 (複数) を基材の表面に微細加工し、ついでその表面上方にカバー、例えば透明ガラスカバーを取り付けることにより組み立てられる。該チップの厚さを介するチャネルおよびチャンパーの断面は、三角形、先端を切断した円錐形、正方形、方形、円形または他のいずれの形状であっても

カバーまたは基材それ自身が半透明セクションであるような、透明または半透明のウィンドウを介して、光学的に検出できる。分析物と結合部の結合後、陽性検定を示す色相、蛍光、発光などの変化は、視覚的にまたは機械によりいずれかで検出できる。器具は、分析物が検出領域中の結合部に結合することによる光学特性の変化を、検出領域の上方に配置された透明カバーを介して検出することができる分光光度計のような検知装置を有していてもよい。

該装置は、さらには、分析物に結合し、分析物の存在を示す検出可能なシグナルを発する、標識化物質のような試薬を検出領域にデリバリーするための手段を有していてもよい。所望により、チップ構造体中に利用されるプロトコルに依存して、器具はまた検定を終えるに必要な試薬を注入するように、例えば、光学的に検出可能な基で標識化した結合蛋白質、酵素との反応用の基質溶液、または他の試薬を注入するように設計されていてもよい。

陽性検定はまた、分析物の結合後に検出可能な凝集または流動インピーダンスにより示される。流体試料中の予め選択された分析物の存在は、流動システムの異なる地点での、圧力または電気伝導度の変化のごとき、分析物誘発の試料流体の流動特性における変化を検知することにより検出してもよい。一の具体例において、例えば、フラクタル (fractal) 領域における、分析物誘発のメソスケール流動システム中の流動性の制限または遮断を、例えば、該装置と組み合わせて用いる器具中の圧力検出器によって検出してもよい。もう一つ別の具体例において、試料流体の導入により引き起こされる流動システムの領域における分析物誘発の伝導度の変化は、流動システムと接触している電気伝導度検知器を介して容易に検出することができる。例えば、分析物の存在は制限された流路の目詰まりを引き起こし、該流路の向こうにて、流体の無いことは伝導度を測定することにより検出できる。器具はさらに、嵌め合わせ領域にて、例えば、流動システムの一部を加熱または冷却する電気抵抗を付与するのに、チップ構造体中に一体成型された接触部と接合する電気接触部を、または流動システムのある領域にて、分析物の存在について陽性表示としての流動制限を示すのに、検知された圧力降み、伝導度などの電気シグナルを受ける電気接触部を有していてもよい。

## 表 1

特徴	利点
柔軟性	チップの数、デザインまたは用途に対して制限なし。
再生可能	チップの信頼できる、標準化された量産が可能。
低コスト生産	既存のシステムと競合する価格設定が可能。一回使用を目的とする使い捨て特性。
小型	高い器具は不要。それ自体、一般的でない lab 環境下にて用いるために設計された携帯用ユニットおよびシステムに役立つ。最少の貯蔵および輸送コスト。
マイクロスケール	必要な試料および試薬が最少。特に高価で、特異的な試験操作の場合に、試薬コストを減少させる。簡単な操作工程が可能。
滅菌性	チップは微生物検定および清潔な環境を必要とする他の操作における使用にて滅菌処理できる。
密封システム	生物学的危険性を最小とする。処理の信頼性を確保。
複数のサーキット性能	単一のチップ上で複数の処理および分析が可能。
複数の検出器性能	検定および処理について、実質的にいずれのシステムまでもモニター性能が拡張する。広範な適用が可能。

メソスケールの装置は広範な生物学的試験または他の試験を行うのに用いることができる。装置は、例えば、共通の流入ポートにより試料が送り込まれ、例えば種々の検出領域にて種々の結合部を有する2またはそれ以上の分離された流動システムからなっているとしてもよく、2またはそれ以上の分析物を同時に検出できる。該装置はまた、対照用流動システムからなっているとしてもよく、その結果、試料領域および対照領域からのデータを検出し、かつ比較できる。本質的に、分子または原子スケールの分析物の存在または濃度あるいは特定の型の細胞の検出を包含するいずれの試験もこのような構造体で有利に実行することができる。このメソスケールの装置は病原性の細菌またはウイルスの検出についての迅速な化学的試験法を提供することができる。該装置はさらにホルモンのような血液構成物の存在または濃度についての迅速な試験を提供することができる。限定されるものではないが、他の適用としての血液型試験のような一群の他の生物学的検定を包含する。

本明細書に開示されている装置はすべて、分子分析物または細胞型のような分析成分と反応し、結合部を有するメソスケールの検出領域により特徴付けられ、分析物の存在または濃度を検出するものである。該装置は検定前に簡単に滅菌処理されていてもよい。検定は容易になされ、その検定の終わりに、チップは廃棄でき、それは有利には試料間の汚染を防止し、危険物質を廃棄し、処分を要するほんの微量の流体が生じるだけの、安価な微小試料分析を提供する。該装置のいくつかの特徴および利点を表1に要約する。

再使用可能なチップ      ある種の適用についてのユーザーの処理当たりのコストの減少。

## 図面の簡単な記載

図1は、固体基材(14)からなる装置であって、その上に機械加工処理された流入ポート(16)が、基材表面に取り付けた透明カバー(12)と、メソスケール流動チャンネル(20)によって連結されている、本発明に係る装置の模式的縦方向断面図である。

図2は、図1の装置の斜視図である。

図3は、装置(10)から試薬または試料流体をデリバリーまたは除去するためのポート(32)を含む、装置(10)を保持するための支持ブロック(30)の断面図である。

図4は、基材上にて左右対称に配置された流動チャンネル(40)のフラクタル分岐状のシステムで加工された基材(14)の模式的平面図である。

図5は、器具(50)中に収め合わせた分析装置(10)の概略図であり、該器具は装置(10)を保持し、装置(10)中の試料流体の圧力を調整し、検出するのに用いられる。

図6は、流入ポート(16)および流動チャンネル(20)を有する一対のメソスケール流動システムを微細加工した基材(14)からなる装置の模式的上面図である。

図7は、流入ポート(16)、流動チャンネル(20)および試料検出チャンパー(22)を有するメソスケール流動システムを加工した基材(14)からなる別の装置の模式的上面図である。

図8は、3本の流路(20)を微細加工した固体基材(14)であって、その流路の各々が一対の検出チャンパー(22)および(24)を形成する固体基材の模式的上面図である。チャンパー(22A)、(22B)および(22C)は、各々、A型血液抗原、B型血液抗原およびRh抗原に対する抗体を含有するが、チャンパー(24A)、(24B)および(24C)は対照用チャンパーである。

図9は、ビーズを含有する3本の試料検出チャンパー(22A)、(22B)およ

び(22C)を微細加工した固体基材(14)であって、そのビーズ上に、各々、A型血液抗原、B型血液抗原およびRh抗原に対する抗体を固定した固体基材(14)の模式的上面図である。

図10A-Dは、基材(14)中のメソスケール流動チャンネル(20)の一部の模式的断面図であって、その上に抗体(103)が固定化されており、分析の間のシステムの変化状態を示す。

図11A-Dは、基材(14)中のメソスケール流動チャンネル(20)の一部の模式的断面図であり、その上にDNA結合プローブ(110)が固定化されており、分析の間のシステムの変化状態を示す。

図12は、流動チャンネルの壁から伸びる、細胞または夾雑物通過突起部(122)を有する不活性基材(14)上の流動チャンネル(20)の断面斜視図である。

図13は、チャンネルの壁から伸びる、細胞貫通突起部(124)を有する不活性基材(14)上の流動チャンネル(20)の断面図である。

図14は、本発明に従って構築した精子機能試験装置の模式的平面図である。

図15は、本発明に従って構築したメソスケールのPCR分析装置の模式的平面図である。

図16は、細胞分別、細胞溶解およびPCR分析を包含する種々の動きをするのに適当な一連のメソスケールのチャンパーを用いて加工した分析装置の模式的上面図である。

図17aは、装置中の流体の伝導度を測定するための電気接触部(17)および(18)を有する本発明の装置の模式的縦方向断面図である。

図17bは、図17aに示した装置の斜視図である。

図18は、一対のフラクタル分岐した流動チャンネル(40)を微細加工した基材の模式的平面図である。

図19は、装置(10)の内容物を観察するために、装置(10)と組み合わせて用いる装置(60)の模式的斜視図である。

図20は、図19の装置(60)の模式的断面図である。

図21は、検定の間に検定成分の一定時間の添加および混合を可能とする曲がり

りくわったチャネル (22A) および (22B) を有するメソスケール流動システムを微細加工した装置 (10) の模式的平面図である。

#### 詳細な記載

本発明は、流体微小試料中の特定の分析物を検出するための、小型の、量産される、典型的には一回使用の装置を提供する。該装置は、典型的には、2ないし3ミリメートル厚のオーダーで、通常には0.2ないし2.0平方センチメートルの、すなわち、試料流入ポートとメソスケール流動システムを形成するように微細加工された固体基材からなる。該メソスケール流動システムは、該流入ポートから伸びる少なくとも1本の試料流動チャネルと、分析物と特異的に結合するための結合部を含有する流動チャネルと流体連絡している少なくとも1つの分析物検出領域からなる。所望により、該結合部は検出領域内に固定化されている。本明細書に開示されているように、メソスケール検出システムは、細胞または高分子の分析を包含し、または反応もしくは細胞培養増殖をモニター観察する、広範な迅速試験に用いることができる。該装置は、種々の分析物についての結合部を含有する2またはそれ以上の異なる検出領域からなり、2またはそれ以上の検定を同時に行うことを可能とする、2またはそれ以上のメソスケール流動システムで加工されている。検定の終わりに、該装置は典型的には廃棄される。

少なくとも1のメソスケールの寸法の流動チャネルおよびチャンバーを有するメソスケール装置は、固体基材物質より大量に設計されかつ加工され得る。正確かつ有効な加工を可能とする技術のため、シリコンが好ましいが、ポリテトラフルオロエチレンのようなポリマーを含む他の材料を用いてもよい。試料流入ポート、試料流動チャネル (複数) および分析物検出領域 (複数) を含むメソスケール流動システム、および他の機能エレメントは、当業者に公知の種々の微細機械加工法のうちいずれかの方法によりシリコン基材より大量に安価に加工される。使用できる微細機械加工法はスパインコーティングおよび化学蒸着、レーザー加工または写真平板技法、例えばUVまたはX線法、または湿式化学プロセスまたはプラズマプロセスを包含するエッチング法のようなフィルム付着方法を包含す

該装置の容量は非常に小さく、従って、分析に要する試料流体の量が減少する。例えば、1cm×1cmのシリコン基材にて、その表面上に10μm幅×10μm厚×1cm (10<sup>4</sup>μm) 長の500個のグループの配列を有する場合、各グループの容量は10<sup>-7</sup>μLであり、500個のグループの全容量は0.5μLである。メソスケール流動システムの低容量は、該装置にてなされる検定の反応速度を向上させる。例えば、質量作用の法則によって予測されるように、固定化した結合部の表面コーティング部を有するメソスケール検出チャンパーにて、メソスケール検出チャンパーの容量が減少すればするほど、検出領域における結合部の容量に対する表面積の比率は増加し、その結果、分析物と結合部の間の分子間反応の速度は増加する。本発明の装置のメソスケール流動システム全体は、典型的には、10μLよりも小さなオーダーの容量を有する。検出チャンパーは、高運動性に有利であるように、少なくとも1の寸法にて十分に小さい寸法である。該装置中のメソスケール流動システムはマイクロリッター容量で、または別にナノリッター容量またはそれ以下の容量で微細加工されている。それは、検定に要する試料および/または試薬流体の量を制限し、有利である。

メソスケール流動システムを含有する分析装置は、該装置に流体をデリバリーし、および該装置から流体を受けるための器具、図5に模式的に示されている器具 (50) と組み合わせる用いることができ、それは、装置 (10) を保持するための、および装置 (10) 上のポート、例えばポート (16) を器具の流動ライン (56) と合致させるための嵌め合わせ部位 (58) と一体化している。該器具は、試料が流動システムを押し進むように、図5にて図示するポンプ (52) のような手段を有している。ある分析物を含有して懸濁させた生物学的流体試料を器具の流入ポート (51) に加えた後、ポンプ (52) を作動させ、該試料を装置 (10) のポート (16) およびメソスケール流動チャネル (20) に押しやる。また、試料を器具によりチップ中に注入してもよく、または試料を毛管作用により流入ポートを介して装置のメソスケール流動システムに入れてもよい。もう一つの具体例において、器具を基材上に設置し、それは装置の流入ポートと連絡する流動ラインを備えている。例えば、該装置上、カバー不在の下で、器具を介して装

る【例、マンズ (Manz) ら、トレンズ・イン・アナリティカル・ケミストリー (Trends in Analytical Chemistry) 10: 144-149 (1991) 参照】。種々の幅および厚みの流動チャネルが、メソスケールの寸法で、すなわち、0.1ないし500μmのオーダーの断面寸法で加工できる。

加工されたメソスケール流動チャネルを含有するシリコン基材は、アノード結合した薄いガラスカバーで覆われ、密封されている。他の透明または不透明カバー材料を用いてもよい。また、2つのシリコン基材が2枚のガラスカバーで挟まれていてもよく、または1のシリコン基材が挟まれていてもよい。透明カバーの使用は、チャネル内容物の動的観察を容易にし、視覚または機械により、いずれかの検出領域の光学プローブを可能とする観察手段をもたらす。他の加工手段を用いてもよい。一具体例において、篩網ネットワークのような生物学的構造の電子顕微鏡写真をマスクとして基材上のメソスケール流動システムを加工するために用いてもよい。メソスケール流動システムは、一連の大きさおよび立体配置にて加工してもよい。

図1および図2にて模式的に示した一具体例にて、装置 (10) はメソスケール流動チャネル (20) を微細加工したシリコン基材 (14) を有し、この場合、その流動チャネルはまた検出領域として供し、予め選択された分析物との結合部を有する結合部を設けていてもよい。流動チャネル (20) の末端にて加工されたポート (16) を介する流動チャネル (20) より、試料または試薬流体を添加してもよく、または回収してもよい。基材 (14) はガラスまたはプラスチックウインドー (12) で覆われている。分析の間、装置 (10) を支持構造体 (30) に設置する (図3)。その支持構造体は装置 (10) の流入ポートを介して試料流体をデリバリーおよび回収するための内部流路 (32) を備えている。シリコンメソスケール装置中の微細チャネルの寸法は幅が約2.0μm~500μm、厚さが約0.1μm~500μmの範囲、細胞または高分子の大きさに匹敵する範囲にて変化してもよい。流体と細胞培養地のような多相物質の流動性は組織的に研究されていない。該装置上の流入ポートはメソスケールの寸法で、または別法としてより大きな寸法で微細加工されている。

装置中に試料を注入することができる。別の器具が、種々の装置による種々の検定プロトコルにて用いるために本発明に従って加工されている。該装置の流動システムは液圧応用にて十分な容量まで満たされていてもよく、該器具を用いて、例えば装置中または器具中に配置したバルブにより、流動システムを介して流体の流れの向きを定めるようにしてもよい。

該分析装置はまた、装置中のメソスケールチャネルの内容物を調べるための器具と組み合わせる用いてもよい。一具体例の器具は、装置中のメソスケールチャネルの内容物を調べるための顕微鏡からなっている。もう一つの具体例において、図19および図20において模式的に示されている器具 (60) にて説明されているように、カメラが該器具に含まれていてもよい。器具 (60) はハウジング (62)、目視スクリーン (64) およびチップを該器具に挿入するためのスロット (66) を備えている。図20の断面図にて示されているように、器具 (60) はまたビデオカメラ (68)、光学システム (70)、および装置 (10) を保持し、装置 (10) の配置および角度を手動で調整できるようにするための傾斜機構 (72) からなる。光学システム (70) はチャネル内容物を拡大するためのレンズシステム、ならびに光源を含む。ビデオカメラ (68) およびスクリーン (64) は、試料流体の特性、例えば流れ特性または色相における分析物誘発の変化を視覚的にモニター観察できるようにし、所望により器具を用いて記録してもよい。

結合部は検出領域と流体連絡している流入ポートを介して溶液中のメソスケール検出領域に導入されてもよい。また、結合部を、例えば流動システムの表面に、または検出領域に配置したポリマービーズのような固相反応体に物理的吸着または化学的結合させることにより、製造後に分析装置のメソスケール検出領域に固定化されている。

シリコン基材中のメソスケール検出チャネルの表面を、化学的に活性化し、蛋白質、脂質、多糖類または他の高分子と反応させ、メソスケール流動チャネルにて被覆表面を形成させてもよい。シリカ質表面を化学的に活性化する方法は当該分野において利用可能である。(例えば、ハラー (Hallar): ソリッド・フェーズ・バイオケミストリー (Solid Phase Biochemistry), ダブリュ・エッチ・ス



コウテン (V. R. Scouten), ジョン・ウィリー編 (Ed. John Wiley), ニューヨーク, 535-597頁 (1983); マンデニウス (Mandenius) ら、アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 137: 106-114 (1984) および 170: 68-72 (1988) およびマンデニウスら、メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 137: 388-394 (参照)。当該分野において生体分子をシリコンに結合させるための多数の方法がある。例えば、酵素を光架橋可能なポリビニルアルコール中の捕獲を介してシリコン装置上に固定化してもよく (ホズ (Howe) ら、IEEE・トランザクションズ・エレクトロン・デバイス (IEEE Transactions Electron Devices), ED33: 499-506 (1986)), または予備成形膜を用いて間接的に結合させてもよい (ハナザト (Hanazato) ら、IEEE・トランザクションズ・エレクトロン・デバイス, ED33: 47-51 (1986))。疎水性二層グリセロールモノオレエートコーティングをシリコン基材上に加工してもよい。フロムヘルツ (Fromherz) ら、バイオchem・バイオフィジ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta), 1062: 103-107 (1991)。

当該分野において公知の蛋白質結合および固定化方法が活性化シリカ質表面を用いるのに通じている。ケネディー (Kennedy) ら、クリン・ケム・アクタ (Clin. Chem. Acta), 70: 1-31 (1976); サンコリ (Sankolli) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Imm. Methods), 104: 191-194 (1987); クリッカ (Kricka) ら、クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.), 26: 741-744 (1980); およびデルカ (Deluca) ら、アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.), 225: 285-291 (1983)。当該分野における公知化学技法は生体分子を被覆または非被覆シリコンチャネル表面に結合させるのに通じている。抗原結合蛋白質、ポリヌクレオチド、プローブ、またはリガンド/レセプター対の一方のような結合部をシリコンチャネル表面に付着させてもよい。表面被覆されたメソスケール流動システムは、免疫検定、酵素検定、リガンド/バインダー検定、ポリヌクレオチド鎖形成検定、および細胞表

面を介してデリバリーし、検出領域中の結合した分析物/結合部の複合体に結合させ、その存在が分析物の存在を示す、光学的に検出できる部分を含む「サンドウィッチ」を生成できる。例えば、先行文献に報告されている免疫金または免疫蛍光標識を用いてもよい。【例えば、ローゼンバーグ (Rosenberg) ら、クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.), 30: 1462-1466 (1984); ローゼンバーグら、クリニカル・ケミストリー 31: 1444-1448 (1985); およびゴイン (Goin) ら、クリニカル・ケミストリー 32: 1655-1659 (1986) 参照】。

液体生物学的流体試料中の分析物が検出領域中の結合部に結合することはまた、装置内のある領域での電気伝導度を検知することにより検出してもよい。検出領域中の結合部に結合している分析物についての電気特性の変化を検出するために、メソスケール管路中の流体の伝導度を測定することができる。例えば、図17aおよび図17bにて模式的に示されている装置 (10) にて伝導度を測定してもよい。装置 (10) はシリコン基材 (14) からなり、その上に流入ポート (16) および流動チャネル (20) が微細加工されている。該基材は透明ウィンドー (12) によりカバーされている。電気伝導度測定は、メソスケール試料流動チャネル (20) と接触して、基材の頂面上に加工されており、基材の底面に伸びる接触部 (17) に連結している電気接触部 (18) を用いてなされる。接触部 (17) は公知の熱勾配溶融法により加工できる (ゼメル (Zemel) ら、ファンダメンタルズ・アンド・アプリケーションズ・オブ・ケミカル・センサーズ (Fundamentals and Applications of Chemical Sensors), D. Schuetzle および R. Hamerle 編, ACS・シンポジウム・シリーズ・309, ワシントン, DC, 1986, p. 2 参照)。装置 (10) は、接触部 (17) を介して伝導度変化を検出する能力を有する、図5に示される器具 (50) のような器具に嵌め合わせられる。伝導度変化は、検出領域中に結合している分析物により誘発される、流体圧のような流体特性の変化と相関させることができる。

分析物の検出領域中の結合部への結合はまた、メソスケール管路のある特別に設計された領域中の試料流体の圧力をモニターすることにより検出できる。例え

ば、面結合検定のような、当該分野において公知の利用できる広範な結合検定にて用いることができる。細胞または高分子分析物の検出は、検出領域の表面に被覆された適当な結合部を選択することにより行うことができる。

加えて、磁性ビーズを装置中に用いてもよく、それは、例えば、該装置と組み合わせて用いられる器具中に位置する磁性部から、外部より加えられる磁場を用いてメソスケール流動システムを介して移動させることができる。検定に要する結合部または他の試薬を磁性ビーズ上に固定化し、例えば、該結合部を検出領域にデリバリーし、分析物に結合させることもできる。分析物を磁性ビーズに取り付けた結合部に結合させた後、例えば、該分析物をさらに複製してもよく、または外部磁場を介して別の分析物についての流動システム中の別の検出領域に移動させてもよい。

分析物の検出領域における結合部への結合は、本明細書中に開示されているように、装置中の試料流体の圧力または電気伝導度をモニターすることを包含する種々の方法のいずれかにて、または視覚的もしくは機械により透明カバーを介する光学検定により検出できる。バルブ、メソスケール圧力センサー、および他の機械センサーのような装置はシリコン基材上に直接加工でき、かつ十分に確立された技法に従って量産できる。アングル (Angell) ら、サイエンティフィック・アメリカン (Scientific American) 248: 44-55 (1983)。

分析物の検出領域中の結合部への結合は光学的に検出できる。最も簡単な具体例は、陽性結果が粒子の凝塊形成または凝集作用により、または色相の発色もしくは変化により示されるものであり、それは最適には顕微鏡の助成を得て、視覚的に観察できる。分析物のメソスケール検出チャンパー中の結合部への結合を検出する光学検定は、蛍光または発光分子のような検出可能な標識またはポリマー支持体、例えばビーズを、自体公知の検定プロトコルを用いて分析物または結合部のいずれかに付着させることにより実行できる。検出領域中の発光または蛍光標識は基材上に配置された透明ウィンドーを介して光学顕微鏡により検出できる。分析物の結合後に結合部により発せられる発光または蛍光シグナルにより分析物を検出できる。別法として、蛍光標識化抗体のような別の標識化物質を流動シス

テムを介してデリバリーし、検出領域中の結合した分析物/結合部の複合体に結合させ、その存在が分析物の存在を示す、光学的に検出できる部分を含む「サンドウィッチ」を生成できる。例えば、先行文献に報告されている免疫金または免疫蛍光標識を用いてもよい。【例えば、ローゼンバーグ (Rosenberg) ら、クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.), 30: 1462-1466 (1984); ローゼンバーグら、クリニカル・ケミストリー 31: 1444-1448 (1985); およびゴイン (Goin) ら、クリニカル・ケミストリー 32: 1655-1659 (1986) 参照】。

液体生物学的流体試料中の分析物が検出領域中の結合部に結合することはまた、装置内のある領域での電気伝導度を検知することにより検出してもよい。検出領域中の結合部に結合している分析物についての電気特性の変化を検出するために、メソスケール管路中の流体の伝導度を測定することができる。例えば、図17aおよび図17bにて模式的に示されている装置 (10) にて伝導度を測定してもよい。装置 (10) はシリコン基材 (14) からなり、その上に流入ポート (16) および流動チャネル (20) が微細加工されている。該基材は透明ウィンドー (12) によりカバーされている。電気伝導度測定は、メソスケール試料流動チャネル (20) と接触して、基材の頂面上に加工されており、基材の底面に伸びる接触部 (17) に連結している電気接触部 (18) を用いてなされる。接触部 (17) は公知の熱勾配溶融法により加工できる (ゼメル (Zemel) ら、ファンダメンタルズ・アンド・アプリケーションズ・オブ・ケミカル・センサーズ (Fundamentals and Applications of Chemical Sensors), D. Schuetzle および R. Hamerle 編, ACS・シンポジウム・シリーズ・309, ワシントン, DC, 1986, p. 2 参照)。装置 (10) は、接触部 (17) を介して伝導度変化を検出する能力を有する、図5に示される器具 (50) のような器具に嵌め合わせられる。伝導度変化は、検出領域中に結合している分析物により誘発される、流体圧のような流体特性の変化と相関させることができる。

分析物の検出領域中の結合部への結合はまた、メソスケール管路のある特別に設計された領域中の試料流体の圧力をモニターすることにより検出できる。例え

ば、試料流体の流入するまたは存在するメソスケール流動システムに連結した圧力検出器は、分析物が結合し、その結果得られる目詰まりまたは流動制限により引き起こされる圧力低下の検出を可能とする。図5は、例示的に、器具 (50) 内に嵌め合わせられる装置 (10) を模式的に示しており、それはポート (16) を介して装置 (10) に入るおよび存在する流体の流圧を検出するための2つの圧力検出器 (54) からなる。検定の間に、粒子が凝塊形成し、または分子が化学的に相互作用してネットワークを形成し、流路を塞ぐかまたは流体粘度を増加させると、その変化は陽性結果として圧力変化として検出できる。メソスケール圧力検出器はまた、シリコン基材上に直接加工してもよい。アングル (Angell) ら、サイエンティフィック・アメリカン (Scientific American) 248: 44-55 (1983)。

検出領域中の結合部に結合している分析物のこの形態の検出は、流動システム中の流動制限に敏感な幾何学的構造により強化することができる。一の実例において、装置中のメソスケール流動チャネルは「フラクタル」パターン、すなわち、連続的に分岐した流動チャネルのパターンで構築されていてもよい。図18は、2つのフラクタル流動システム (40) を微細加工した構造体 (14) からなる装置 (10) の一具体例を模式的に説明するものである。フラクタル状に分岐するチャネルは、図4にて模式的に説明されているように、逐次狭くした流動チャネルを提供し、各分岐で寸法を減少させながらシリコン基材上に加工してもよい。図4は、ポート (16) に連結した流動チャネル (40) のフラクタル状に分岐したシステムで加工された基材 (14) の模式的平面図である。この具体例におけるチャネルは対称的に配置されており、基材の中心に向かって逐次狭くなる。これらのフラクタル状に構築された流動システムにおける流体流動性は、流体粘度および、例えば、細胞の増殖または細胞、粒子もしくは試料中に存在するかもしれない高分子複合体の凝集により引き起こされる流動制限の発生に対して非常に敏感である。流動制限に基づく分析物の存在の検出は米国特許出願 [Attorney Docket No. UPA002 (8261/3)] に記載されている。その開示を出典明示により本明細書の一部とみなす。

フラクタル状に設計した微細チャネルは、例えば、基板上の透明カバーを介して光学的に検出することができる流体粘度の変化により、流動インピーダンスを基礎として、例えば、培養基中の微生物の増殖を容易にモニター観察することを可能とする。試料中の微生物の存在および増殖はフラクタル内の流動特性に影響を与えるであろう。1またはそれ以上の圧力センサーを用いて、フラクタル流路中またはその向こうに存在する分析物によって引き起こされる流体特性の変化により圧力変化を検出してもよい。分析物の結合後の伝導率の変化は、流動領域と接触している電気伝導率検知電極を介して容易に検出できる。例えば、図4において、装置(10)のフラクタル領域(40)の目詰まりは、投入ポート(16A)から排出ポート(16B)への分析物の流れを遮断し、通常の伝導率プローブ(17)により検出され、その出力は流出チャネル中の水性流体の存在または不在を表す。結合部は、フラクタル領域に、例えばフラクタル流路の表面に、またはビーズのような固相反応体上に固定化して設けられ、分析物に結合し、フラクタル流路中の流動制限を強化してもよい。

当該分野において公知の多数の結合検定方法が本発明のメソスケール検出システムにて活かすことができる。

分析物と結合部の検出領域における反応は凝集により検出できる。検出領域中、分析物または分析物/結合部複合体との結合能を有する蛍光または発光標識化分子またはビーズを用い、検出領域上の透明カバーを介し、光学顕微鏡により結合部と分析物の凝集を検出することができる。例えば、メソスケール検出チャンパー中の血液細胞の凝集は、試料の血液型についての陽性試験として供することができる。化学的にまたは吸着により、抗体を検出領域の表面に被覆し、血液型について陽性試験を示す凝集を誘発してもよい。血液試料を蛍光染料と混合し、血液細胞を標識化し、凝集反応の光学検定を行うことができる。蛍光ビーズに結合させた抗体もまた用いることができる。種々の抗体を有する複数の検出領域をメソスケール流路にて加工し、一の装置にて、例えばA型、B型およびRh型の血液を同時に検定できる。

抗体サンドイッチ検定および酵素免疫法のような当該分野において公知の免疫

化学検定技法を被覆層のメソスケール検出領域にて活用し、予め選択された分析物を検出してもよい。[イムノアッセイについての論文として、ボルトン(Bolt on)ら、ハンドブック・オブ・エクスペリメンタル・イムノロジー(Randbook of Experimental Immunology)、Weir, D. M. 編、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ(Blackwell Scientific Publications)、オックスフォード、1986、第1巻、第26章参照]。一の実例において、分析物が抗原であり、結合部は標識化された抗原結合蛋白質、例えば蛍光標識化抗体である。また、サンドイッチ免疫検定を行うことができ、この場合、蛍光標識化抗体のような標識化した結合分子を用い、検出領域にて形成された分析物/結合部複合体に検出可能なように結合する。サンドイッチ免疫検定の一例が図10A-Dにて模式的に説明されており、この場合、基材(14)におけるメソスケール流動チャネル(20)の表面は分析物(104)との結合能を有する抗体(103)で被覆されている。図10Bおよび10Cは、流動チャネルにおける分析物(104)の抗体(103)への結合を示している。ついで、図10Dに図示するように、その後、結合分析物と複合体を形成する蛍光標識化抗体(105)の添加により、結合分析物を検出する。蛍光標識化複合体は蛍光計を用いて検定領域上の透明ウィンドウを介して検出できる。

例えば、フルオレセイン標識化結合部より放出される発光が、装置のメソスケール流動システムにて容易に検出される。一の実例において、発光放出は、例えば、光電子増倍管、またはカメラ・ミノメーターを包含する、マイクロプレート・リーダーを用いてメソスケール流動システムにて容易に検出できる。一の実例において、分析物との結合能を有する2種の抗体からなる結合部を用いることにより分析物を検出してもよい。この場合、一の抗体は光を放出するフルオレセインで標識化されており、他方は光を吸収するローダミンで標識化されている。ローダミンおよびフルオレセイン標識化抗体が夫々分析物に結合すると、分析物の存在を示す、フルオレセインのクエンチが観察できる。ナカムラ(Nakamura)ら、eds., イムノケミカル・アッセイズ・アンド・バイオセンサー・テクノロジー・フォー・ザ・ナインティーン・ナインティーズ(Immunochemical Assays and

Biosensor Technology for the 1990s)、アメリカン・ソサイエティー・オブ・マイクロバイオロジー(American Society of Microbiology)、ワシントン、D.C. pp. 205-215。一の実例において、フルオレセイン標識化抗体を検出領域に固定化する。ついで、分析物およびローダミン標識化抗体を検出領域にデリバリーし、分析物の存在を示すフルオレセインのクエンチが観察される。もう一つ別の具体例において、細菌性磁性粒子に連結し、被覆するフルオレセイン標識化抗体を免疫検定にて用いてもよい。この場合、該抗体は分析物との結合能を有する。ナカムラ(Nakamura)ら、アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 63: 268-272 (1991)。この具体例において、フルオレセイン標識化抗体に連結した細菌性磁性粒子の凝集は、分析物についての陽性検定を示す。蛍光性のクエンチを引き起こす。凝集およびその結果生じるクエンチは、例えば、器具と組み合わせ用いられる。器具に配置した磁性源を介して、磁場をメソスケール検出領域に加えることにより強化される。

別の具体例において、当該分野において公知のポリヌクレオチド鎖形成検定を行ってもよい[マニヤティス(Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス(Cold Spring Harbor Press)、1989]。図11にて模式的に説明されているように、基材(14)の流動チャネル(20)の表面はポリヌクレオチドプローブ(110)で被覆されている。相補的分析物のポリヌクレオチド(104)を固定されたポリヌクレオチドプローブ(110)に結合させた後、別の検出可能な、例えば、蛍光標識化高分子プローブ(105)を加えて試料のポリヌクレオチドに結合させることができる。蛍光発光の検出は陽性検定を示す。

別の具体例において、メソスケール流動システムは、細胞上または細胞内の高分子あるいは細胞外流体中の成分を下流分析するための、調製物中、生体流体試料からの選択された細胞集団を分離するためのチャンパーを有している。メソスケール分離領域は蛋白質のような特徴的な細胞表面分子を介して標的細胞と可逆的に結合する能力を有する固定化された結合部を有する。メソスケールの

分離領域は、動力学的に細胞と結合部の結合を強化する。一の実例において、細胞は固定化されたままであるが、細胞外流体は下流に流れて分析される。他方、例えば、バッファー流で細胞を洗浄するために、流動を続けてもよい。高速流および高速圧で、洗浄された細胞が分離領域より放出され、分析のために下流に移動させる。

本発明の装置はまた、メソスケール流動チャネルと流体連絡し、mRNAのような細胞内分子について分析する前に、細胞を溶解させる細胞溶解手段からなっている。図13に示されているように、細胞溶解手段は、流動チャネル(20)の表面から伸びる、細胞膜を貫通する突起部(124)からなっている。流体流は該貫通突起部(124)を押しとおるため、細胞が破壊される。細胞残骸を除去し、細胞内分析物を分析する。シリコンのような物質の鋭角片を用い、メソスケール流動システムでトラップし、十分な流動圧を加えて細胞を溶解させる。もう一つ別の具体例において、流動チャネルは、簡単に、十分な流動圧を加えた場合に細胞溶解を実行する制限された断面の領域からなる。これらの装置は、典型的には、細胞含有試料を細胞溶解手段に押し込み、十分な流動圧を加えた場合に細胞溶解を生じさせるための手段、例えばポンプ手段を有する器具と連結して用いられる。加えて、該細胞溶解手段は、細胞溶解剤からなっている。当該分野において知られている細胞溶解剤を用いてもよい。

図12に示されているように、流動チャネル(20)の表面はまた、大きさにより細胞を分離するためのモレキュラー・シーブを構成要素とする突起部(122)を有している。典型的には、細胞試料が、低下圧で流動チャネルを介して流れると、突起部(122)の間を通過できる細胞だけが流動チャネルを通り抜けて流れることができる。

メソスケール装置はまた、酵素反応を行うのに用いてもよい。基材中に加工されたメソスケール酵素反応チャンパーは、酵素反応についての最適温度を得るように温度調整されている。酵素反応チャンパーと流体連絡している。流入ポートが設けられていてもよく、試薬および酵素検定に必要な他の成分を添加または取り出すことができる。そのようなチャンパーを組み立てている検定装置は、

図5に模式的に示されている、酵素反応チャンバーの温度を調整し、器具(50)の流動チャンネル(56)および装置(10)のポート(16)を通して検定成分をデリバリーまたは回収するための手段を有する、器具(50)のような器具に収められている。該器具を用いて、試料または試薬流体を装置に添加する時間を設定してもよい。反応チャンバーの温度を調節するために、該装置を該装置と組み合わせる器具中の嵌め合わせ部位にて用いてもよい。該装置の反応チャンバーを加熱または冷却するために、電気加熱または冷却エレメントを嵌め合わせ部位に設けてもよい。別法として、電気接触部を基材中に設け、器具中の電気接触部と接合させ、反応チャンバーを加熱または冷却する電気抵抗を付与してもよい。

一の具体例において、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をメソスケール反応チャンパーにて行い、試料中のポリヌクレオチドを検出することができる。反応チャンパーと流体連絡している流入ポートより、核酸、プライマーおよびTaqポリメラーゼのような必要な試薬の添加が可能である。連鎖反応は、当該分野において確立されている方法【マニアティス(Manoatis)ら、モレキュラー・クロニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989】に従って行ってもよい。図15にて図示されている一の具体例は、シリコン基材(14)中に微細加工された一対のメソスケールPCR反応チャンパー(164)および(166)を有するPCRチップ(10)である。増幅させるべきポリヌクレオチド含有溶液を、流入部(16A)から、流路(20)を介して反応チャンパー(164)および(166)にデリバリーする。それらチャンパーは、各々、例えば、電気的に94℃および65℃に加熱されている。ポンプをポート(16B)を介して取り付け、流体をチャンパー(164)(ポリヌクレオチド脱離形成が生じる)とチャンパー(166)(重合が起こる)の間で循環運動させる。ポート(16C)は該システムを排出するのに用いることができ、所望によりまた、Taqポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、プライマー、およびポリメラーゼ反応に必要な他の試薬をデリバリーするのに用いてもよい。検出チャンパー(22)を、ビーズ上に固定化された標識化ポリヌクレオチドプローブのよ

うな標識化結合部を含有する、メソスケール流動システムに設け、増幅されたポリヌクレオチド産生物の存在を検出する。

操作では、PCRチップ(10)を、図5に図示する器具(50)のような、チップを保持するための嵌め合わせ部位を含有する、器具と組み合わせる。器具(50)はポート(16A-D)に接合した流路(56)を備えている。該器具はまた、ポート(16A-D)を機械的に閉鎖させるようにバルブを有する。器具(50)を用いて生物学的試料の流体を流入ポート(16A)からフィルター(168)を介して反応チャンパー(164)および(166)にデリバリーする。流入ポート(16A)を介してデリバリーする前に、プライマー、ヌクレオシド三リン酸、およびTaqポリメラーゼのような試薬をポリヌクレオチド試料に加えてもよく、または所望により、器具により、ポート(16C)を介して試料チャンパー(164)および(166)中の試料にデリバリーしてもよい。試料をPCR反応チャンパー(164)および(166)にデリバリーした後、該器具を用いてポート(16A)および(16D)を閉鎖する。ポート(16C)は排出口として開いたままである。ついで、器具(50)に配置されたポンプを用いて、ポリヌクレオチド脱離形成のために94℃に加熱したチャンパー(164)と、重合反応のために65℃に加熱したチャンパー(166)の間で流体を循環させる。

チャンパー(164)と(166)の温度は、例えば、反応チャンパーの下方面に基材中に一体成型された電気接触部により調整され、その電気接触部は器具中の電気接触部と接合することができる。また、光学レーザーを用い、例えば基材上に配置されたガラスカバーを介して、または基材それ自体の透明領域を介して該反応チャンパーを加熱してもよい。ポリメラーゼ循環反応が完了したら、ポート(16A)および(16C)を閉じ、ポート(16D)を開いて反応生成物を、標識化されたポリヌクレオチドプローブ、例えば蛍光ビーズ上に固定化されたプローブを含有する、検出チャンパー(22)にデリバリーする。重合生成物は、例えば、検出領域上に配置した透明カバーを介して、視覚的に、標識化プローブと重合したポリヌクレオチド生成物の凝集を観察することにより検出される。メソスケールPCR分析に関する方法および装置は米国特許出願[Attorney Docket No. UPA

004 (8261/5)]に記載されており、その開示を出典明示により本明細書の一部とみなす。

もう一つ別の具体例にて、該装置を用いて酵素反応を行ってもよく、図21に模式的に示されている装置(10)で説明されているように、それでは試料と試薬成分の混合および添加の時間が設定される。装置(10)の基材(14)は、流入ポート(16)、流動チャンネル(20)、反応チャンパー(22A)および(22B)ならびに検出チャンパー(22C)で微細加工されている。反応チャンパー(22A)および(22B)は、各々、曲がりくねったメソスケール流動チャンネルからなる。該曲がりくねったチャンネルの通路長は、試料および試薬成分の混合および添加時間を設定するように設計できる。該装置は器具と組み合わせるポートを該装置のポートに接合させて用いてもよく、それで該装置の流動システムを介して流体をデリバリーおよび受容することができ、所望により検出チャンパーにて陽性結果の光学的に検出することができる。一の具体例として、試料のコレステロール含有量を検定することができる。コレステロールエステラーゼを流入ポート(16A)を介して加え、バッファーおよび試料を流入ポート(16B)および(16C)を介して加える。ついで、該混合物をチャンネル(20D)を介して曲がりくねった混合/反応チャンネル(22A)に流す。混合および反応の時間は適当な長さの曲がりくねったチャンネルを微細加工することにより予め決定することができる。コレステロールオキシダーゼをポート(16D)を介して加え、チャンネル(20G)を介して曲がりくねったチャンネル(22B)に流し、それで一定時間のオキシダーゼとチャンネル(22A)からの流体の混合および反応が生じる。基材上に配置された光学ウィンドウを介して検出チャンパー(22C)を観察することにより陽性結果が視覚的に検出できる。検出チャンパー(22C)は酵素反応の生成物と検出できるように反応する能力を有する結合部を備えていてもよい。該装置は一連の臨床酵素反応および他の反応に用いてもよい。

所望により、チップの構造体にて活用されているプロトコルに依存して、さらに検定を完了するのに必要な試薬を注入するように、例えば光学的に検出可能な基で標識化した結合蛋白質、基質溶液または他の試薬を注入するように器具を設

計してもよい。装置(10)中のメソスケール流動チャンネル(20)における流体流の圧力は、器具中に設けた圧力検出器(54)により検出できる。一の検定または一連の検定についてのデータ収集を助成するように、マイクロプロセッサが器具中に設けられていてもよい。検定の精度を増すために、流動システム中に対照領域、例えば、結合部を有しない領域を含めるように基材を加工してもよく、それで、試料は検出領域および対照領域の両方に向けられる。対照領域を介して流れる試料流体由来のデータを取り出し、試料検出領域より得られるデータと比較して、該検定の精度を向上させることができる。

上述した記載は例示であり、本発明は本明細書に記載の構造体および方法の範囲内に含まれる別の形態とすることができる。当業者であれば変形および修飾を行うであろうし、そのような変形および修飾は請求の範囲にて定義したのと同様に本発明の一部であると考えられる。

次に例示である実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例1

幅が変化する流動チャンネル(20)を用いて加工した一連のシリコン基材(14)(第6図に概略示した)において、赤血球および固定された抗-A抗血清の毛管凝集を試験した。シリコン基材1-5は、深さ10μmおよび幅20~300μmを有する流動チャンネル(20A)および(20B)を含む(第2表)。まず、該チャンネルに抗体を充填し(毛管作用)、次いで、それを乾燥させることによって、該チャンネルの内側の表面に抗-A(1:10希釈)を塗布した。次いで、毛管作用によって流入ポート(16)からチャンネル(20)中にA型血液(1:5に希釈した)を導入し、該チャンネルを顕微鏡を使用して視覚的に観察した(ライツ・アリストメット(Leitz Aristomet)). 結果を第2表に示す。

第2表

基材番号	深さ(μm)	チャンネル幅(μm)	凝集
1	10	A: 20	+
		B: 40	+
2	10	A: 60	+
		B: 80	+
3	10	A: 100	+
		B: 120	+
4	10	A: 150	+
		B: 200	+
5	10	A: 250	+
		B: 300	+

## 実施例2

チャンネルの両側の流入ポート(16)および中央検出チャンバー(22)を有する流動チャンネル(20)を用いて微細加工したシリコン基材(14) (第7図に概略示した)上にプラスチック(3M透過性シート)カバーを装着することによって、プラスチック-シリコンハイブリッドを加工した。抗-A (0.05M炭酸水素ナトリウム(pH 9.6)中の希釈液および食塩水中A型血液の1:10希釈液を、ホルダーを使用して注射器を介してチャンネル(20)の両側の流入ポート(16)中に導入した。中央チャンバー(22)中で該溶液を一緒に混合させ、プラスチックカバーを通して、光学顕微鏡によって凝集を観察した。結果を第3表に示す。

(22A~C)を有する分析素子(14)を使用する(第8図に概略示した)。チャンバー(22A)の表面は、血液型A抗原に対する抗体で感作されており、チャンバー(22B)は、血液型B抗原に対する抗体で感作されており、チャンバー(22C)は、アカゲザル抗原に対する抗体で感作されている。チャンバー(24A)、(24B)および(24C)の表面は、未処理であり、陰性の対照として使用される。指を刺して採取した血液試料を、注射器を使用してポート(16)を通して装置中に引き込む。3つのチャンバー(22A~C)の表面への赤血球の結合を観察する。個々のチャンバー(22A、22Bおよび/または22C)の表面上の赤血球の存在は、血液型抗原に対する陽性の結果を示す。次に、試料を含む分析装置を廃棄する。

## 実施例5

血液試料の血液型の判定のために、流入ポート(16)から広がるチャンネル(20)によって連結した3つのチャンバー(22A、22Bおよび22C)を有する分析素子(14) (第9図に概略示す)を使用する。チャンバー(22A)は、血液型A抗原に対する抗体で感作されたビーズを含有しており、チャンバー(22B)は、血液型B抗原に対する抗体で感作されたビーズを含有しており、チャンバー(22C)は、アカゲザル抗原に対する抗体で感作されたビーズを含有している。指刺血液試料を、注射器を使用して装置中に引き込む。赤血球のビーズへの結合および結果としてのチャンバー中での凝集を観察する。個々のチャンバー中の凝集した赤血球の存在は、血液型抗原に対する陽性の結果を示す。次に、試料を含む分析装置を廃棄する。

## 実施例6

血液試料の血液型の判定のために、流入ポート(16)から広がるチャンネル(20)によって連結した3組のチャンバー(22A、22Bおよび22C)を有する分析素子(14) (第8図に概略示した)を使用する。該素子は、対照チャンバー(24A、24Bおよび24C)も含む。チャンバー(22A)の表面は、血液型A抗原に対する抗体で感作されており、チャンバー(22B)は、血液型B抗原に対する抗体で感作されており、チャンバー(22C)は、アカゲザル抗原に対する抗体で感作されている。

第3表

抗-A	希釈	チャンネル中の凝集
ガンマ・キット (Gamma Kit)	1:20	+
ガンマ・ネズミ・モノ (Gamma Murine Mono)	1:20	+
ガンマ・ヒト希釈 (Gamma Human Dilution)	1:5	+
イムコア・アフィニティ・ピュア (Imucor Affinity pure)	1:100	+
イムコア腹水 (Imucor Ascites)	1:100	+

## 実施例3

チャンネルの両端に微細加工した流入ポート(16)およびメソスケール中央混合チャンバー(22)を有するメソスケール流動チャンネル(20)でエッチングされたシリコン基材(14) (第7図に概略示した)の上に一片のプラスチック(3M透過性シート)を接着させることによって、プラスチック-シリコンハイブリッドを加工した。マウスIgGの溶液(0.05M炭酸水素ナトリウム(pH 9.6)中50μg/mL) (SIGMA Cat.no. 1-5381) およびヤギ抗-マウスIgG (H&L) -蛍光カルボキシレイトビーズ (ポリサイエンス、インコーポレイテッド

(Polysciences, Inc.)) のPBSバッファー中1:20希釈液を、ホルダーを使用して注射器を介して、チャンネルの両側の流入ポート中に導入した。中央チャンバー(22)中で該溶液を一緒に混合させ、透明プラスチックカバーを通して、光学顕微鏡によって凝集を観察した。

## 実施例4

血液試料の血液型の判定のために、流入ポート(16)から広がる3組のメソスケール対照チャンバー(24A~C)に連結した3組のメソスケール分析チャンバー

チャンバー(24A~C)の表面は、未処理であり、陰性の対照として作用する。指刺血液試料を蛍光色素と混合し、次いで、注射器を使用して流入ポート(16)中に引き込む。3つのチャンバー(22A、22Bおよび/または22C)における蛍光赤血球の表面への結合は、微量蛍光計を使用して迅速に観察され、血液型抗原に対する陽性の結果を示す。次に、試料を含有する分析装置を廃棄する。

## 実施例7

第4図に概略示される装置において、微生物の増殖をモニターする。基材(14)におけるフラクタルメソスケール流路(40)に、流入ポート(16A)を介して、試験標本の試料を接種した増殖培地の混合物2μLを充填する。該装置を密封し、37℃で60分間インキュベートする。顕微鏡を使用して視覚的に検査することによって、または、チャンネルシステムの流れ特性を、例えば、導電率プローブ(17)を介して測定することによって、増殖を検出する。流れがないことは、増殖を示し、結果として、チャンネルシステムの封鎖を示す。

## 実施例8

第14図に示す微細加工固体基材(14)で精子機能を試験する。精子試料を流入ポート(16)に添加し、次いで、メソスケール流動チャンネル(20)を通して、各々試験添加部(140)を有する検出チャンバー(22A~D)まで流す。検出チャンバー(22A)は、白血球に関する試験を提供し、一般的な白血球抗原に対する固定された抗体を含有するビーズを含む。検出チャンバー(22B)は、精子抗体に関する試験を提供し、ヒトIgGに対する抗体を固定したビーズ (例えば、バイオラッド(Bio-Rad)、イムノビーズ (Immunobead) Cat. No. 170-5100) を含有する。チャンバー(22C)は、アクロソーム反応に関する試験を提供し、フルオレセイン標識レクチンを含有する。チャンバー(22D)は、精子-子宮頸部相互作用に関する試験を提供し、ヒアルロン酸またはウシ子宮頸部粘液を含有する。チャンバーにおける凝集は、視覚的に手動で、または機械によって、検出される。フラクタル流動チャンネル(40)を使用して、試料の流れ特性を試験する。精子試料がフラクタル流路に沿って移動する距離は、精子運

動性の指示因子として供される。別法としては、枝分かれしない流動チャネルなどの別の形態で加工されたメソスケール流動システムを利用することもできる。

#### 実施例9

第15図に概略示す装置において、ポリメラーゼ連鎖反応を行って、流体試料中のポリヌクレオチドの存在を検出する。第15図に示す装置(10)は、メソスケール流動チャネル(20)に接続した流入ポート(16A-D)を用いて微細加工した固体基材(14)を含む。メソスケール流動チャネル(20)は、PCR反応チャンバー(164および166)、フィルター(168)および検出チャンバー(22)も装備している。装置(10)は、例えば第5図における器具(50)のように、器具と共同で使用され、すなわち、流路、流動ポンプならびに反応チャンバー(164および166)の温度を制御するための温度制御素子を装備している。器具は、また、ポート(16A、16B、16Cおよび16D)と流動的に連絡している、アッセイの間にポートを可逆的に開閉させるバルブを有する流体流路も含む。

PCR分析を行って細胞中のポリヌクレオチドを検出するために、Taqポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、ポリヌクレオチドプライマーおよびPCRアッセイに必要な他の試薬の緩衝化溶液に試料細胞溶解物を添加する。該試料細胞溶解物は、器具を介し、流入ポート(16A)を通してPCR反応チャンバー(164および166)に運搬される。ポート(16Aおよび16D)は、器具中に含まれるバルブによって閉じられ、一方、ポート(16Bおよび16C)は、開いている。反応チャンバー(164および166)の温度を調節するために、器具中に電気的手段などの手段が含まれている。ポート(16B)を通して接続される器具中のポンプを使用して、ポリヌクレオチドデハイブリダイゼーションのための94℃に設定した反応チャンバー(164)と、ポリメラーゼ反応のための65℃に設定した反応チャンバー(166)との間で試料流体を循環させる。ポート(16C)は、ベントとして供される。ポリメラーゼ連鎖反応が終了した後、ポート(16C)は、閉じられ、(16D)は、開けられ、ポート(16B)に接続している器具中のポンプを使用

通ってメソスケールPCRチャンバー(164および166)まで続く。器具中のバルブを使用して、ポート(16B)を開け、ポート(16A)を閉じる。Taqポリメラーゼ、プライマーおよびPCRアッセイに必要な他の試薬を、器具中の合致するポートおよび流路からポート(16C)を通してチャンバー(164および166)に添加する。ポート

(16B)を介して接続された器具中のポンプを使用して、各々、94℃および65℃に設定されたチャンバー(164および166)間でPCR試料および試薬を循環させて、ポリヌクレオチドデハイブリダイゼーションおよび重合サイクルを行い、ポリヌクレオチド生成物の生成および単離を行う。器具中のバルブを使用して、ポート(16C)を閉じ、ポート(16D)を開ける。ポート(16B)に接続された器具中のポンプを使用して、細胞個体群から単離された重合ポリヌクレオチドを、相補ポリヌクレオチドプローブなどの固定用結合部分を含有するフラクタル検出領域(40)に向かわせる。フラクタル領域(40)における流れ制限は、細胞内ポリヌクレオチドについての陽性のアッセイを示す。

#### 実施例11

メソスケール流動チャネルにおいて、化学発光ペルオキシオキシレート有機相反応を行った。シアルム(Cyalume™)ライトスティック(ウイスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチ(Aldrich))を開け、ペルオキシオキシレートおよびフルオロフォアの混合物(成分A)を試験管中にしたり落とした。オキシダントを含有するガラスバイアルを取り出し、アルコールで洗浄した。該バイアルの内容物(成分B)を試験管に移した。成分Aの100μL試料および成分B50μLを一緒に混合して、化学発光反応を開始させた。

蛍光溶液の試料を、幅812μm、深さ400μmおよび長さ5.2mmの大きさのチャンバーを装備したチップ#6の中央流入ポート中に導入した。いずれの過剰の試料もチップの表面から取り去り、該チップを、変形したマイクロエルストリップホルダー中に置いた。アマーライト(Aerlite)マイクロプレートリーダー(イギリス、アマーシャムのアマーシャム・ダイアグノス

として、PCR反応チャンバー(164および166)から検出チャンバー(22)に試料を運搬する。検出チャンバー(22)は、増幅したポリヌクレオチドを結合する能力を有するポリヌクレオチドプローブを固定している蛍光検出ビーズを装備している。増幅したポリヌクレオチドの標識ポリヌクレオチドプローブとの凝集は、検出領域(22)一面に配置された窓を通して検出可能であり、増幅したポリヌクレオチド生成物の存在に関する試験を提供する。

#### 実施例10

第16図に概略示されている基材(14)を含むマルチ試験装置(10)を使用して、生物細胞含有流体試料中の細胞内ポリヌクレオチドの存在を検出する。該装置は、第5図に示される器具(50)のように、器具と共同で使用される。器具は、可逆的に開閉されるバルブを含む、装置(10)におけるポートと合致するポートを有する流路を含んでおり、アッセイの間に該装置におけるポートを機械的に開閉させる。該器具は、反応チャンバー(164および166)の温度を調節するために、基材(14)に埋め込まれた接触部と合致する電気的接触部などの手段も含む。器具は、さらに、装置(10)を通して流体の流れを制御するためのポンプを含む。

まず、器具中のバルブを使用して、ポート(16Cおよび16D)を閉じ、一方、ポート(16Aおよび16B)は、開いたままである。器具中のポンプによって試料を試料流入ポート(16A)に向かわせ、メソスケール流路(20A)を通して、所望の細胞個体群上の表面分子に選択的に結合させるためのチャンバーの壁に固定された結合部分を含有するチャンバー(22A)に流す。チャンバー(22A)における所望の細胞個体群の結合後、バッファーを有する流れは、ポート(16B)を通して排出されつつ、細胞個体群を精製および単離し続ける。次いで、ポート(16B)は、閉じられ、ポート(16C)は、開けられる。次に、流れを充分に増大させて、単離した細胞をチャンバー(22A)の表面からチャンバー(22B)に移転させる。ここで、チャンバー(22B)における膜貫通突出部(124)が細胞を破り、細胞内物質を放出させる。

試料の流れは、大きな細胞膜および他の残骸を運去するフィルター(168)を

ティクス・リミテッド(Amersham Diagnostics Ltd.))を使用して、メソスケール流動チャネルからの発光を測定した。チップ#5において幅300μm、深さ20μmのメソスケール流動チャネル(容量70.2pL)を使用して、同様の実験を行った。発光(ペルオキシオキシレートケミルミネセンス)を検出し、ルミネセンス・マイクロプレート・リーダーを使用して、種々のチップにおけるメソスケール流動チャネルからRLU(比光単位)の単位で測定した(第4表)。

第4表

チップ	チャネル容量	発光(RLU)
#6	1702pL	718.26
#5	70.2pL	35.63

#### 実施例12

水性相反応において、イソルミノールの、化学発光ホースラディッシュペルオキシダーゼ触媒酸化を試験した。以下のとおり、ルミノール過酸化水素試薬を調製した：ナトリウムルミノール(12.5mg)をトリスバッファー(0.1mol/L、pH8.6)50mLに溶解させた。過酸化水素(30%w/v)15.5μLをトリスバッファー(0.1mol/L、pH8.6)0.5mLと混合これらの2つの溶液を合わせ、光から保護した。ルミノール過酸化水素試薬(100μL)、4-ヨードフェノール((アルドリッチ)、トリスバッファー0.1mol/L中1mg/mL、pH8.6)、およびホースラディッシュペルオキシダーゼ(VI A型、1mg/mL)のトリスバッファー(0.1mol/L、pH8.6)中の希釈液10μgを一緒に混合した。この溶液の試料をチップ#6における中央チャンバーまたはチップ#5の300μmチャネル中に導入した。次いで、アマーライト・マイクロプレート・リーダーを使用して、発光を測定した。

ルミネセンス・マイクロプレート・リーダーを使用して、種々のメソスケールチャンネルにおけるルミノールのホースラディッシュペルオキシダーゼ触媒酸化による発光を検出した。ペルオキシダーゼ母液の希釈を使用したペルオキシダーゼアッセイによって、投与量に依存する関係が判明した（第5表）。

第5表

チップ	チャンネル容量	ペルオキシダーゼ希釈	発光 (RLU)
#6	1702 pL	非希釈	0.18 <sup>*</sup>
		1:10	4.68
		1:100	2.23
		1:1000	1.82
#5	70.2 pL	非希釈	2.09

\* 基材の消耗のための低い光度

## 実施例13

メソスケール流動チャンネルにおける化学発光反応を写真によって検出した。実施例11および12の記載に従って、チップ#6のメソスケールチャンネルにペルオキシオキシレートまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ（10 μg/mL）-ルミノール-過酸化水素混合物を充填した。該チップを、カメラルミノメーター（イギリス、パーミンガムのウルフソン・アプライド・テクノロジー（Wolfson Applied Technology））中でインスタント写真用フィルム（ポラロイド（Polaroid）、タイプ612）と接触させることによって、発光を検出した。高速インスタント写真用フィルムを使用して、メソスケール流動チャンネルにおける種々の化学発光反応による発光を検出した（第6表）。ペルオキシダーゼ反応からの低い光度は、より長い露出時間を必要とした。

μm、深さ1.5 mm）からなるチップにおいて、メソスケール流動システムにおける精子試料の子宮粘液との相互作用を試験した。該チャンネルにHTF-BSA溶液を充填し、子宮粘液試料（患者の月経周期の約14日目採取した）を各中央チャンパー中に置いた。子宮粘液は、月経周期のこの時点で精子に敵対することが知られているので、予想されるように、精子は、子宮粘液中に移行せず、浸透しなかったものは死んだ。モヒッシン（Moghissi）ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・オブステトリクス・アンド・ガynecology（Am. J. Obstet. Gynecol.）、114:405（1972）。

## 実施例16

ヒアルロン酸の精子試料との相互作用の試験を行って、精子試料の子宮相互作用特性を評価した。該試験は、各末端でメソスケール流動チャンネル#1、#2、#3および#4（長さ3.25 mm、幅100 μm、深さ20 μm）によって流入口に各々連結している2つのチャンパー（長さ5.2 mm、幅750 μm、深さ1.5 mm）からなるチップで行った。チャンネル#1は、対照チャンネルであった。チャンネルに、HTF-BSA溶液およびヒアルロン酸（シグマ（Sigma））のHTF-BSA中溶液を充填した（チャンネル#2、#3、#4、各々、5 mg/mL、2.5 mg/mLおよび1.3 mg/mL）。各中央チャンパー中に精子試料を置いた。精子は、5 mg/mLのヒアルロン酸を含有するチャンネル#2中に移行しなかったが、チャンネル#3および#4中でヒアルロン酸の濃度が低下するにしたがって、移行度が増大した。

## 実施例17

精子試料中のIgG抗体の存在についてのイムノビーズ試験を行った。ヒトIgGに対する抗体を塗布したマイクロビーズであるイムノビーズ（カリフォルニア州リッチモンドのバイオラッド（BioRAD））をHTF-BSA溶液（カリフォルニア州サンタナのアーヴィン・サイエンティフィック（Irvine Scientific））中で1 mg/mLに希釈した。ガラス-シリコンチップ中のマイクロチャンネル（幅250 μm、深さ20 μm、長さ10 mm）にイムノビ-

## 第6表

露出時間 検出 (D)  
非検出 (ND)

ペルオキシオキシレート反応	1秒	D
	5分*	D
ホースラディッシュペルオキシダーゼ反応	10分	D

\* 室温で2日間インキュベーション後。

## 実施例14

メソスケール流動システムを使用して、種々の殺精子薬を試験する実験を行った。ノンオキシノール（nonoxynol）-9およびC13-G（ペンシルベニア州のバイオシン、インコーポレイテッド（Biosyn, Inc.））の殺精子活性の同時試験のために、各末端でチャンネル（長さ3.25 mm、幅100 μm、深さ20 μm）によって流入口に各々連結している2つのチャンパー（長さ5.2 mm、幅750 μm、深さ1.5 mm）からなるチップを使用した。4つのチャンネルに、各々、HTF-BSA溶液（チャンネル#1、対照）、0.005%（チャンネル#2）、0.0125%（チャンネル#3）および0.05%（チャンネル#4）ノンオキシノール-9（またはC13-G）を充填した。精液試料を各チャンパー中に置き、顕微鏡を使用して、精子の接触したチャンネル中への進行をモニターした。チャンネル中で観察された精子の数は、精子数の減少する順番で以下のとおりであった：チャンネル#1>#2>#3>#4。対照チャンネル中には、ほとんどの精子が見られ、殺精子作用のための最適濃度のノンオキシノール-9またはC13-Gを含有したチャンネル#4中では全く見られなかった。

## 実施例15

各末端でチャンネル（長さ3.25 mm、幅100 μm、深さ20 μm）によって流入口に各々連結している2つのチャンパー（長さ5.2 mm、幅750

μm、深さ1.5 mm）からなるチップにおいて、メソスケール流動システムにおける精子試料の子宮粘液との相互作用を試験した。該チャンネルにHTF-BSA溶液を充填し、子宮粘液試料（患者の月経周期の約14日目採取した）を各中央チャンパー中に置いた。子宮粘液は、月経周期のこの時点で精子に敵対することが知られているので、予想されるように、精子は、子宮粘液中に移行せず、浸透しなかったものは死んだ。モヒッシン（Moghissi）ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・オブステトリクス・アンド・ガynecology（Am. J. Obstet. Gynecol.）、114:405（1972）。

前記の記載は、説明のためになされたものであり、本発明は、本明細書中に記載した構造および方法の意図する範囲内で別の形態を取り得ると解される。変形および修飾は、当業者が考えつくであろうし、このような変形および修飾の全ては、請求の範囲に定義されている本発明の一部であると考えられる。

FIG.1

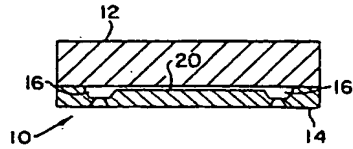


FIG.2

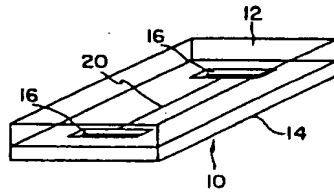


FIG.3

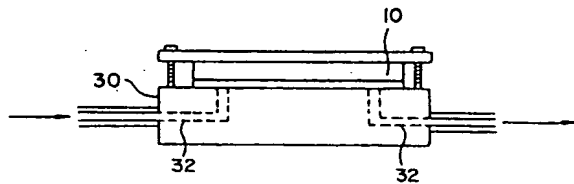


FIG.5

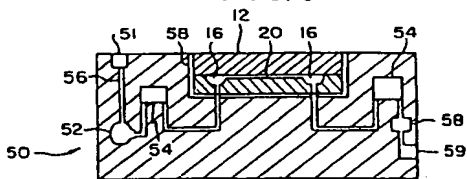


FIG.6

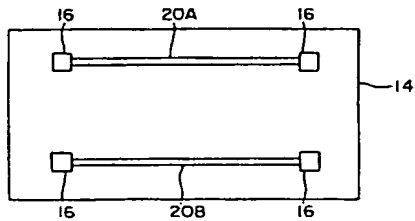


FIG.7

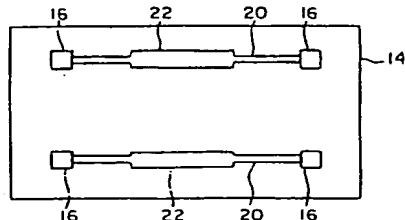


FIG.4

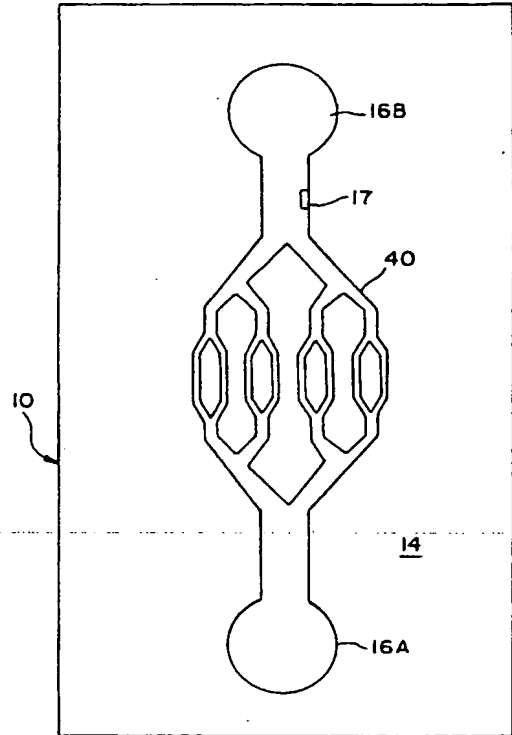


FIG.8

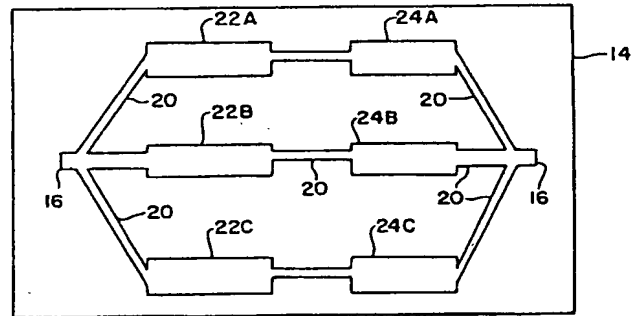


FIG.9

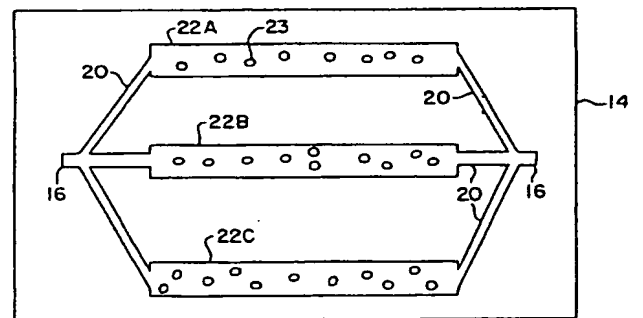


FIG. 10A

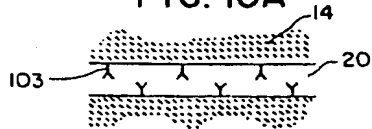


FIG. 10B

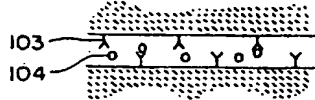


FIG. 10C

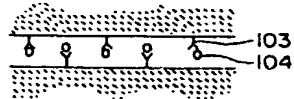


FIG. 10D

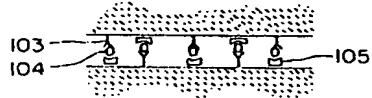


FIG. 11A

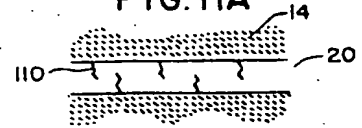


FIG. 11B

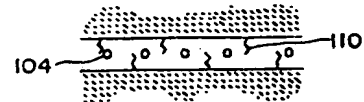


FIG. 11C

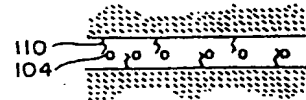


FIG. 11D

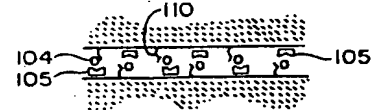


FIG. 12

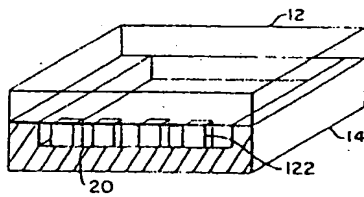


FIG. 13

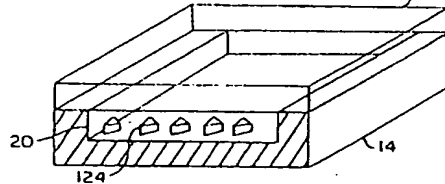


FIG. 16

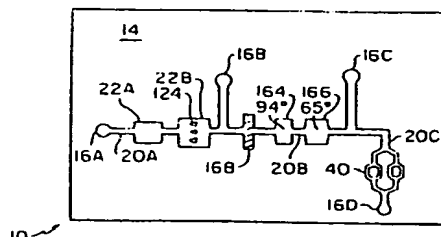


FIG. 14

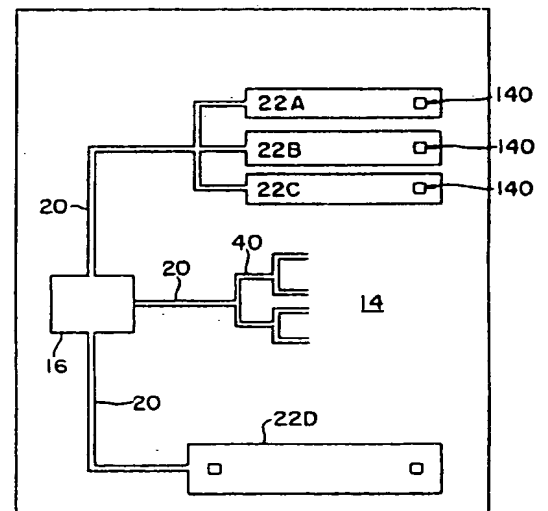




FIG. 15

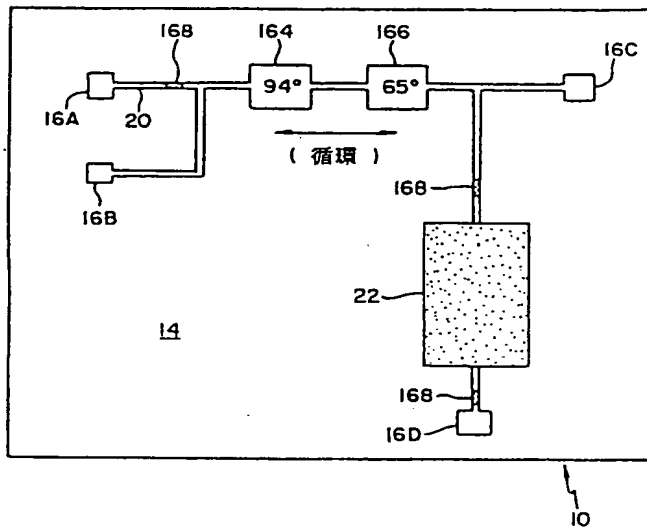


FIG. 17b

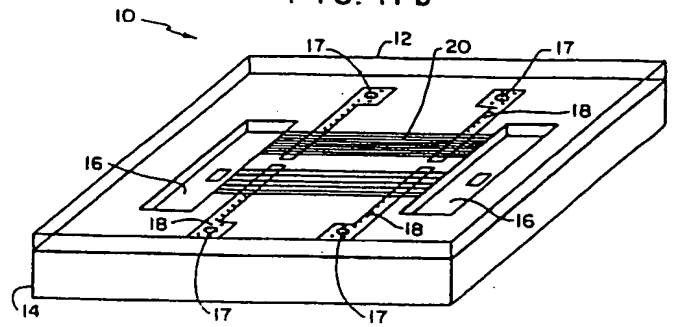


FIG. 17a

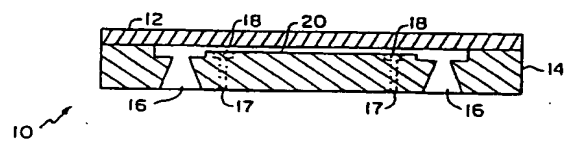


FIG. 18

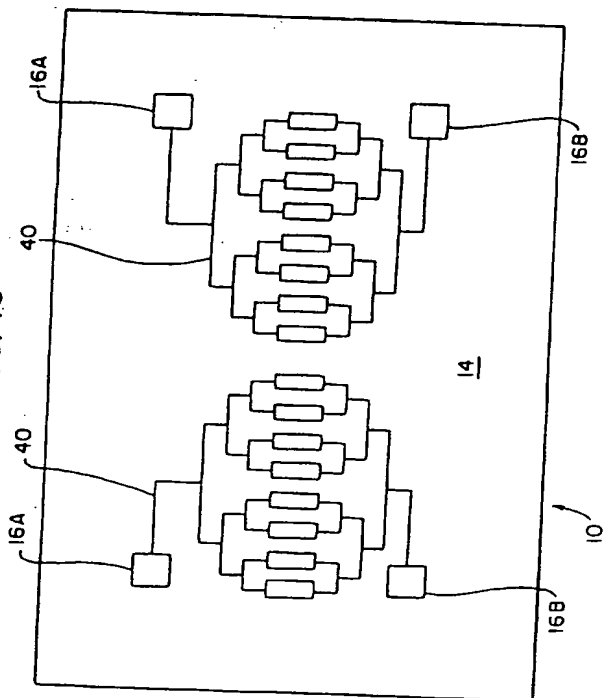


FIG. 20

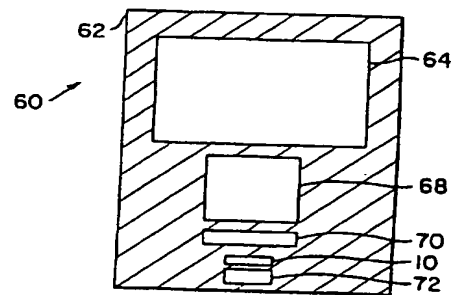
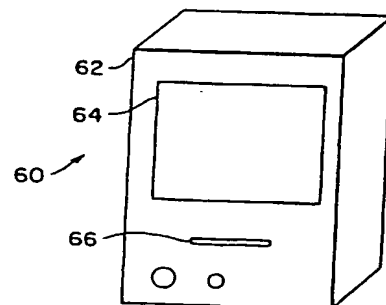
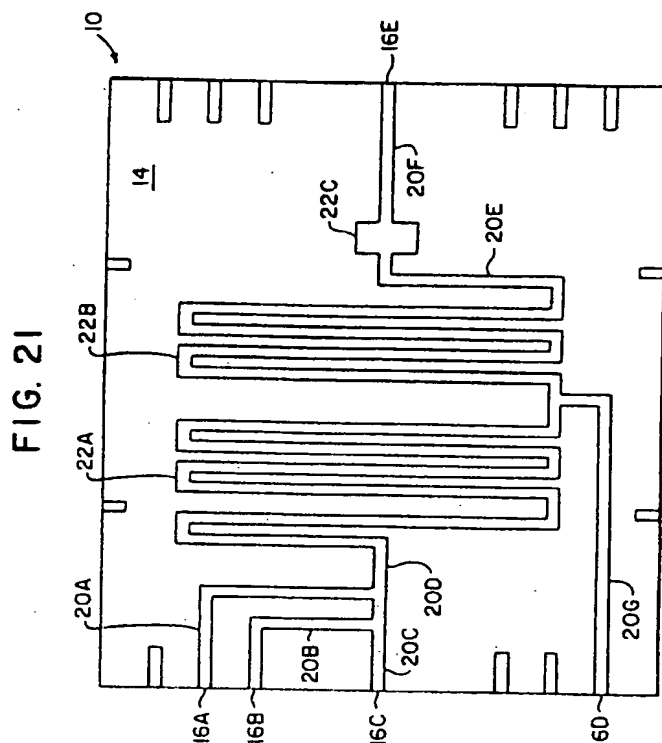


FIG. 19



## 國際調查報告

PCT/US 93/04013



**FIG. 21**

<b>1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> In several classification systems apply, indicate only: According to International Patent Classification (IPC) or to both Patent Classification and IPC:												
Int.Cl. 5 G01J3/00;		G01N33/543										
<b>2. FIELDS OF SEARCH</b> <table border="1"> <tr> <td>Classification System</td> <td>Classification System</td> </tr> <tr> <td>Int.Cl. 5</td> <td>BOIL ; GOIN</td> </tr> </table>				Classification System	Classification System	Int.Cl. 5	BOIL ; GOIN					
Classification System	Classification System											
Int.Cl. 5	BOIL ; GOIN											
Documents considered under both Maximum Documented in the extent that both Documents are included in the Patent Document												
<b>3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*</b> <table border="1"> <tr> <th>Category<sup>1</sup></th> <th>Citation of Document<sup>2</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages<sup>3</sup></th> <th>Reference to Class No.<sup>4</sup></th> </tr> <tr> <td>X</td> <td>           EP,A,0 483 117 (BIOTRACK)            29 April 1992            see page 2, line 35 - line 45            see page 5, line 16 - line 21            see page 5, line 53 - line 57            see page 6, line 26 - line 30            see page 8, line 6 - line 52            see page 11, line 7 - line 13            see page 11, line 38 - line 39            see page 12, line 16 - line 54            see page 15, line 8 - line 38         </td> <td>           1-13,            27-35            1            1-2            6-0            3-5            9-13            12         </td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>           WD,A,9 009 596 (VALE)            23 August 1990            see page 6, paragraph 3 - page 8,            paragraph 1; figure            see page 10            see page 8, paragraph 2         </td> <td>           1            12         </td> </tr> </table>				Category <sup>1</sup>	Citation of Document <sup>2</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>3</sup>	Reference to Class No. <sup>4</sup>	X	EP,A,0 483 117 (BIOTRACK) 29 April 1992 see page 2, line 35 - line 45 see page 5, line 16 - line 21 see page 5, line 53 - line 57 see page 6, line 26 - line 30 see page 8, line 6 - line 52 see page 11, line 7 - line 13 see page 11, line 38 - line 39 see page 12, line 16 - line 54 see page 15, line 8 - line 38	1-13, 27-35 1 1-2 6-0 3-5 9-13 12	A	WD,A,9 009 596 (VALE) 23 August 1990 see page 6, paragraph 3 - page 8, paragraph 1; figure see page 10 see page 8, paragraph 2	1 12
Category <sup>1</sup>	Citation of Document <sup>2</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>3</sup>	Reference to Class No. <sup>4</sup>										
X	EP,A,0 483 117 (BIOTRACK) 29 April 1992 see page 2, line 35 - line 45 see page 5, line 16 - line 21 see page 5, line 53 - line 57 see page 6, line 26 - line 30 see page 8, line 6 - line 52 see page 11, line 7 - line 13 see page 11, line 38 - line 39 see page 12, line 16 - line 54 see page 15, line 8 - line 38	1-13, 27-35 1 1-2 6-0 3-5 9-13 12										
A	WD,A,9 009 596 (VALE) 23 August 1990 see page 6, paragraph 3 - page 8, paragraph 1; figure see page 10 see page 8, paragraph 2	1 12										
* "relevant" indicates that the document is relevant to the subject matter of the invention. "A" document published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "X" other documents but published or not after the international filing date. "L" documents which have been studied or examined by the applicant or by the examiner in order to establish the state of the art. "G" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "N" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "P" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "R" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "S" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "T" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "U" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "V" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "W" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "Y" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance. "Z" documents published in the patent literature or in the technical literature but not considered to be of particular relevance.												
<b>IV. CERTIFICATION</b> Under the Authority of the International Bureau 27 AUGUST 1993 22 SEP. 1993 HOCQUET A.P.												

Form PCT/ISA/210 (current version) January 2013

B. REFERENCES CITED IN DISCUSSION		Examination of Applicant's Pro	PCT/US 93/04013
EXCERPTS FROM THE SECOND SHEET			
Language	Content of Excerpt, with Indication of Appropriate, if the relevant parameter		Reference to Claim No.
A	<p>EP.A.0 430 248 (NOCHIDA PHARMACEUTICAL CO. LTD)  5 June 1991  see page 5, line 32 - line 51  see page 6, line 39 - page 7, line 12;  figure 14  see page 10, line 13 - line 45  see page 14, line 51 - page 15, line 2;  figures 11,21</p>		<p>1</p> <p>2-11  14,15</p>
A	<p>SCIENTIFIC AMERICAN  vol. 248, no. 4, 1983, US  pages 35 - 47  ANGELL ET AL. 'silicon micromechanical devices'  cited in the application  see page 43, column 1, line 55 - column 2,  line 23  see page 45, paragraph 3</p>		<p>1</p> <p>14-15</p>
A	<p>SENSORS AND ACTUATORS A  vol. 21-23, 1990,  pages 433 - 434  PFAHLER ET AL. 'liquid transport in micron  and submicron channels'  see figures 1,2  see page 434, discussion, figure 7</p>		<p>1</p>
A	<p>US.A.4 999 283 (ZAVOS ET AL.)  12 March 1991  see column 6, line 24 - line 31; figures  see column 6, line 49 - line 59</p>		<p>1-2,13</p>

Page 25 of 25

## 國際調查報告

US 9304013  
SA 74250

This report sets the personal family members relating to the personal documents cited in the above-mentioned international search report. The members are contained in the European Patent Office (EPO) file on The European Patent Office is in no way liable for these parameters which are merely given for the purpose of information. 27/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family numbers	Publication date
EP-A-0483117	29-04-92	US-A- 4756884	12-07-88
		AU-B- 593001	01-02-90
		AU-A- 5088486	12-02-87
		CA-A- 1275231	16-10-90
		EP-A- 0212314	04-03-87
		EP-A- 0485368	13-05-92
		EP-A- 0488994	03-06-92
		JP-A- 62129759	12-06-87
		US-A- 4963498	16-10-90
		US-A- 4940861	14-08-90
		US-A- 5004923	02-04-91
		US-A- 5164598	17-11-92
		US-A- 5144139	01-09-92
		US-A- 5204525	20-04-93
		US-A- 5140161	18-08-92
WD-A-9009596	23-08-90	AU-A- 5034150	05-09-90
		EP-A- 0456699	21-11-91
EP-A-0430248	05-06-91	AU-A- 6702690	06-06-91
		CA-A- 2031001	31-05-91
		JP-A- 3223674	02-10-91
		US-A- 5147607	15-09-92
US-A-4999283	12-03-91	None	

2011-12-15

For more details about this space, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/83

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 33/543	5 8 1 Z	7055-2 J	

(31)優先権主張番号 8 7 7, 6 6 2  
 (32)優先日 1992年5月1日  
 (33)優先権主張国 米国 (US)  
 (31)優先権主張番号 8 7 7, 7 0 1  
 (32)優先日 1992年5月1日  
 (33)優先権主張国 米国 (US)

(31)優先権主張番号 8 7 7, 7 0 2  
 (32)優先日 1992年5月1日  
 (33)優先権主張国 米国 (US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP  
 (72)発明者 ゼメル, ジェイ・エヌ  
 アメリカ合衆国19046ペンシルベニア州、  
 ジェンキンタウン、ミーティングハウス・  
 ロード223番